

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares



CARACTERIZACIÓN DEL CONTENIDO EXOSOMAL EN LA
RESPUESTA A CISPLATINO EN CÁNCER DE PULMÓN NO
MICROCÍTICO Y CÁNCER DE OVARIO: ESTUDIO DE SU
SIGNIFICADO CLÍNICO EN BIOPSIA LÍQUIDA

Tesis Doctoral

Julia Jiménez Hernández

Madrid, 2019

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



CARACTERIZACIÓN DEL CONTENIDO EXOSOMAL EN LA
RESPUESTA A CISPLATINO EN CÁNCER DE PULMÓN NO
MICROCÍTICO Y CÁNCER DE OVARIO: ESTUDIO DE SU
SIGNIFICADO CLÍNICO EN BIOPSIA LÍQUIDA

Julia Jiménez Hernández

Licenciada en Biología

Directores de tesis:

Dra. Inmaculada Ibáñez de Cáceres

Dr. Javier de Castro Carpeño

Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz
Laboratorio de terapias experimentales y nuevos biomarcadores en cáncer

Inmaculada Ibáñez de Cáceres, Doctora en Biología e Investigadora “Miguel Servet” contratada por la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital la Paz (FIB-HULP) y del Instituto de Investigación Sanitaria IdiPAZ y **Javier de Castro Carpeño**, Doctor y Oncólogo Médico, Jefe de sección del Hospital Universitario la Paz y Coordinador de la Unidad de Oncología Torácica del Hospital HM Sanchinarro

CERTIFICAN:

Que Dña. Julia Jiménez Hernández, Licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral con el título: **“Caracterización del contenido exosomal en la respuesta a cisplatino en cáncer de pulmón no microcítico y cáncer de ovario: Estudio de su significado clínico en biopsia líquida”**, que reúne los requisitos de originalidad y rigor necesarios para ser presentado y evaluado por el tribunal correspondiente para optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que conste a todos los efectos, firman la presente autorización para la defensa de esta Tesis en Madrid a 10 de junio de 2019.

Dra. Inmaculada Ibáñez de Cáceres
Directora de Tesis

Dr. Javier de Castro Carpeño
Co-Director de Tesis

“Si nos vamos a acabar riendo de esto, ¿por qué no empezar ahora?”

Richard Bandler

Agradecimientos

Cuando leía los agradecimientos de las tesis se me antojaba otro trámite más que el doctorando tenía que añadir en su tesis. Pero hasta que no lo he vivido, hasta que no he tenido que atravesar cada una de las fases de este camino de obstáculos que supone elaborar una tesis doctoral, con sus “llevo un año entero dándome de cabezazos y no tengo ni un p*** resultado”, seguido de “estos resultados no tienen ningún sentido!!” para terminar con “mierda, ahora que empiezo a ver la luz al final del túnel, y ya no me queda tiempo!!!” y “me va a explotar un órgano del estrés!!!!” (**Figura 0**), no me he dado cuenta de todo lo que tengo que agradecer a la gente que me ha acompañado. A todas y cada una de las personas que han hecho que el camino haya sido más fácil o, al menos, más feliz.

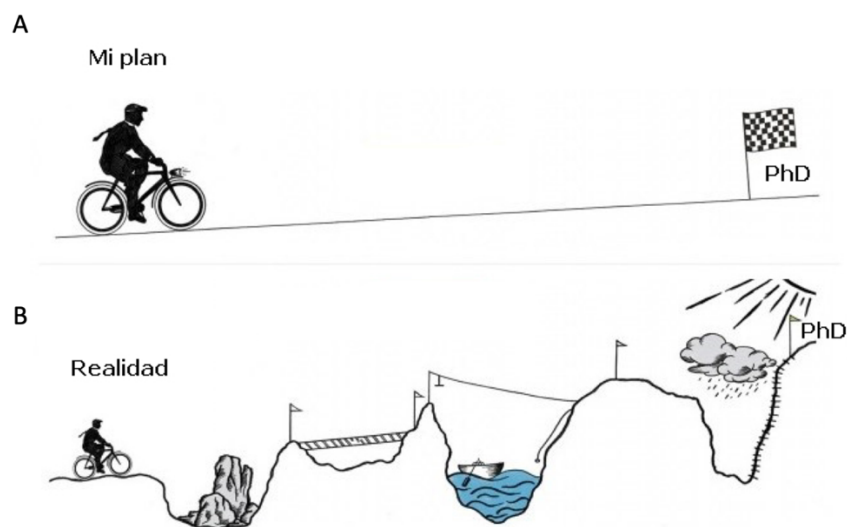


Figura 0. Representación gráfica del proceso de realización de una tesis doctoral. **(A)** Lo que tu crees que será. **(B)** Lo que es en realidad.

En primer lugar, quiero agradecerte, Inma, mi directora de tesis, la oportunidad que me diste, hace ya casi 7 años, abriéndome las puertas de tu laboratorio. Abriéndome las puertas a la investigación y a este mundo tan maravilloso que es la ciencia. Gracias por todo lo que me has enseñado, por transmitirnos siempre tu amor incondicional por lo que haces y por haber confiado en mí para formar parte de esta bonita “familia científica”. Gracias por guiarme en este proceso de aprendizaje y crecimiento científico y personal. Y gracias por apoyarme a seguir mi propio camino, mil gracias Inma. También quiero dar las gracias a mi co-director de tesis, el Dr. Javier de Castro, por haber hecho esto posible y por aportarnos la visión clínica, demostrando que el avance se consigue cuando trabajamos todos en equipo. Gracias por tus consejos y tu amabilidad. Gracias también a Mariló, por abrirnos puertas que estaban cerradas, por tu profesionalidad y tus ganas de conocer nuestra labor investigadora.

AGRADECIMIENTOS

Y, como no podía ser de otra manera, mil millones de gracias a ti Carmencita, por enseñarme lo *preciosos* que son los exosomas, por tu apoyo, tus ánimos, tus consejos, por tu conocimiento infinito, por estar siempre y siempre con una sonrisa, por ponerme firme cuando era necesario y por ser tan buena persona, GRACIAS. Gracias a Pernía, por haber sido mi maestra de poyata, por enseñarme tanto desde que entré al laboratorio y porque las risas y los llantos son siempre mejores cuando se comparten con alguien tan especial como tú. Gracias a Charles, por resolver todas las veces que haga falta mis dudas sobre secuenciación masiva (que no han sido pocas), por nuestro primer *pisito* a orillas del Manzanares y por las risas de cuando todavía no habías subido al cielo de los bioinformáticos. Gracias a Roro, por hacer que parezca fácil saberse los nombres de todos los fármacos, por tu crisis de los 30 y por esas *cerves* terapéuticas de después del labo. Gracias a mi polluela, Miranda, por haberme ayudado tanto en esta última etapa, por nuestras charlas y por darme la tranquilidad de que los exosomas se van a quedar en tan buenas manos. Gracias a Itsaso, por haber traído tu alegría y naturalidad al laboratorio (a parte de tu incansable ayuda con la estadística). A los peques, Álvaro, Julián, Ruth, y a las vecinas, Anita y Elenita, gracias por hacer del laboratorio de epigenética (y metabólicas) un lugar de compañerismo y buen ambiente. Sin olvidarme de mis compis de cultivos, Jaime y Pablo, gracias por vuestro buen rollo y por nuestra *república independiente de cultivos*, no hubiera sido lo mismo sin vosotros. Y gracias a Gema, por confiar en mi y por ayudarme siempre que lo he necesitado.

Muchísimas gracias a Rosario, por acogerme en tu laboratorio y hacerme sentir una más en todo momento, por ser un ejemplo como persona y como mujer científica. Y gracias a las chicas del 1.11, Bea, Laura, Elena, Cris, por esos ratitos tan buenos mientras me peleaba con los Western Blot y por ese rincón de la felicidad siempre lleno de palmeritas, kikos y gusanitos. Gracias también a Lucía (y a Juan), por enseñarme lo maravillosa que es la citometría, por compartir las alegrías que nos ha dado y también los *sustacos* de última hora. Mil gracias Antonio, por tu don para la estadística y por explicárnosla de esa forma tan alucinante.

Quiero agradecer al Dr. Goodsell por hacer de la ciencia un arte y por haberme enseñado tanto durante mi estancia en San Diego, thank you for your kindness and your beautiful way to see the science. Y gracias a todo el laboratorio de Molecular Graphics, Stefano, Sole, Martina, Giulia, Francesca, Adam, Ludo, Diogo, Patricia, Michelle, Jerome y Gary, gracias por haberme hecho sentir como en casa a 10.000km de distancia y por haber ayudado tanto a que la experiencia haya sido tan brutal en todos los aspectos. Y, por supuesto, gracias a Andrés y Paula, porque cruzarme con vosotros ha sido genial, por nuestros *piñitos* y por la cocina chino-

colombiana, gracias por los atardeceres en el Scripps, los fish-tacos, las risas y los viajes por California.

Gracias a mis bioguines, por ser un apoyo tan grande siempre, por ser mi segunda familia, por nuestros viajes y por las cervezas siempre. A Diego, por los *castores* y dar rienda suelta a nuestra imaginación y creatividad, por nuestro humor negro y por ser una persona tan jodidamente especial. Gracias Guaspi por tus abrazos de oso que estrujan el alma, por tu risa hipercontagiosa y por tus bailes indescritibles (que deberías patentar). Gracias a Andreus, por nuestros momentos de crisis bañados con sidra, por nuestro amor infinito por Asturias, por hacer que me sienta un poquito matamalteca, por el feminismo y por tu cariño. Gracias a Guille, Lucas, Lauren y Cris, porque habernos encontrado en la carrera ha sido un regalo maravilloso del universo.

Gracias a Mariadel, Sergio y Juls, por estar ahí, por los señores en culo regando, por los güeceptogues, las gaitas y las foliadas, y por que si, *yo qué se ya*. Gracias a mi familia postiza por el cariño y por hacerme siempre sentir como en casa, por los arroces en Alicante y los huevos rellenos. Y gracias a los amigos postizos morataleños por acogerme y hacerme sentir parte *del barrio*.

Gracias Hyrule, por haber sido un mundo paralelo maravilloso en el que olvidarme de la tesis a ratitos.

Gracias a mi gran familia, la “piña” Jiménez, gracias por estar ahí siempre, por nuestras reuniones multitudinarias tan divertidas y gracias por aportar esa parte organizada y disciplinada de mi cerebro que tanto me ha ayudado durante la tesis. Gracias por el concurso encubierto de quién es capaz de comer más roscón, por los room escape y por el amor por la buena comida hecha en casa. Gracias Guille, por hacer “tu magia” de programador y evitar que me pegara un tiro con los Excel, gracias por tu buen rollo siempre y por ser una de las mejores personas que conozco.

Gracias Abuela, por ser un ejemplo para todos nosotros, por nuestras charlas al teléfono dándome ánimos con la tesis, por tus 90 años tan bien llevados (yo firmaba ya mismo) y por tu fortaleza física y espiritual.

AGRADECIMIENTOS

Y por supuesto gracias a mi pequeña familia, gracias mamá, por haberme enseñado que ser feliz es algo que se elige y a disfrutar siempre de lo que haga, a mirar hacia dentro para crecer hacia fuera y a sacar siempre lo bueno de las personas. Gracias por tu manera de ver el mundo y hacer que lleve el arte en las venas. Gracias por tu cariño incondicional e infinito, por ser el mayor apoyo que se puede tener. Gracias papá, por haberme enseñado a amar la naturaleza y a cuestionarme las cosas. Gracias por hacer que lleve la curiosidad y la ciencia en las venas. Por tu sabiduría infinita, los abrazos y por llenarnos siempre el estómago y el alma con cocina de la buena. Y gracias a mi monito, por aguantar mis perrerías de desde que nació y aun así convertirme en un apoyo inquebrantable. Gracias por ayudarme a crecer, ponerme las gafas violetas y enseñarme el significado de sororidad. Gracias por tu vitalidad, tu energía y por tener un corazón que no te cabe en el pecho. Gracias mi pequeña.

Y, por último, no hay palabras suficientes para agradecerte todo lo que has hecho y haces por mi. Gracias por haber sido el punto de apoyo para salir del pozo y volver a ver el mundo. Por ser el mejor compañero con quien compartir este viaje, por tu paciencia, por tu templanza, por tu honradez y tu bondad. Por enseñarme tanto y por quererme tan bien. Gracias por tu cariño y por darme las herramientas para pintar de colores mi mundo.

GRACIAS

Índice

ÍNDICE

RESUMEN.....	21
ABSTRACT.....	25
ABREVIATURAS.....	29
INTRODUCCIÓN.....	33
1. Cáncer.....	33
1.1 Cáncer de Pulmón.....	34
1.2 Cáncer de Ovario.....	38
1.3 Cisplatino.....	41
2. Vesículas Extracelulares.....	42
2.1 Exosomas.....	43
2.2 miARNs y proteínas exosomales en cáncer.....	49
HIPÓTESIS.....	55
OBJETIVOS.....	55
MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
1. Modelo digital.....	59
2. Cultivos celulares.....	59
3. Recogida y procesamiento de muestras de pacientes. Seguimiento y datos clínicos.....	61
4. Aislamiento y purificación de los exosomas y de los miARNs exosomales.....	62
4.1 Aislamiento de exosomas procedentes de cultivos celulares.....	63
4.2 Aislamiento de exosomas de plasma sanguíneo.....	64
5. Identificación y caracterización de los exosomas.....	65
5.1 Microscopía electrónica de transmisión.....	65
5.2 Nanosight.....	65
6. Ensayos de internalización con citometría de flujo.....	66
7. Ensayos de incubación con exosomas y viabilidad a cisplatino.....	67
8. Secuenciación masiva de miARNs exosomales e identificación bioinformática de candidatos.....	68
9. Validación de los niveles de miARNs candidatos: retrotranscripción y PCR cuantitativa.....	69
10. Transfección con mimics y curvas de viabilidad a CDDP.....	71
11. Análisis proteómico.....	71
11.1 Digestión triptica.....	72
11.2 Síntesis de péptidos.....	73
11.3 Análisis proteómico <i>shotgun</i> mediante espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).....	73
11.4 Análisis de proteómica dirigida MRM.....	74
12. Análisis estadístico.....	75
RESULTADOS.....	79
PARTE 1. MODELO VISUAL INTEGRADO DE UN EXOSOMA CIRCULANTE.....	79
1.1 Componentes.....	79
1.2 Concentraciones.....	82
1.3 Generación del modelo.....	84
PARTE 2. PAPEL DE LOS EXOSOMAS EN LA INDUCCIÓN DE RESISTENCIA A QUIMIOTERAPIA:	
SELECCIÓN DEL MODELO DE ESTUDIO.....	89
2.1 Caracterización de los exosomas aislados a partir del secretoma de cultivos celulares.....	89

2.2 Selección del modelo experimental adecuado para la caracterización del contenido exosomal y su papel en la respuesta a platino en cáncer de pulmón y ovario.....	89
PARTE 3. CARACTERIZACIÓN ÓMICA DEL CONTENIDO EXOSOMAL: SELECCIÓN Y VALIDACIÓN	
DE CANDIDATOS.....	94
3.1 Análisis del microRNoma exosomal e identificación de miARNs candidatos como biomarcadores de resistencia a CDDP.....	94
3.2 Identificación de un miARN endógeno específico del contenido exosomal.....	96
3.3 Validación dirigida de los miARNs candidatos.....	99
3.4 Ensayos funcionales de sobreexpresión con miARNs sintéticos.....	100
3.5 Análisis del proteoma exosomal e identificación de proteínas candidatas como biomarcadores de resistencia a CDDP.....	103
PARTE 4. ESTUDIO TRASLACIONAL DE LOS MIARNs Y PROTEÍNAS EXOSOMALES COMO	
POTENCIALES MARCADORES DE USO CLÍNICO.....	106
4.1 Características de las cohortes de estudio y tablas demográficas.....	106
4.2 Validación del panel de miARNs endógenos en biopsia líquida para la determinación del mejor miARN normalizador exosomal.....	110
4.3 Relevancia clínica de los miARNs candidatos en CPNM.....	113
4.4 Validación traslacional y relevancia clínica de las proteínas candidatas.....	117
4.5 Análisis integrado de los biomarcadores exosomales y su valor como panel predictivo de respuesta a platino en CPNM.....	119
DISCUSIÓN.....	125
1. IMPORTANCIA DE LA VISUALIZACIÓN 3D DE ESTRUCTURAS BIOLÓGICAS PARA UNA	
MAYOR COMPRENSIÓN DE SU COMPLEJIDAD Y FUNCIÓN.....	125
2. IMPLICACIÓN DE LOS MIARNs Y PROTEÍNAS EXOSOMALES EN RESPUESTA A CISPLATINO	
EN CPNM.....	126
2.1 La sensibilidad celular a cisplatino se modifica tras la internalización de los exosomas procedentes de células resistentes.....	127
2.2 Significado clínico de los niveles exosomales del miR-142-3p y miR-451a como potenciales biomarcadores de respuesta a CDDP en CPNM.....	129
2.3 El miR-151a-3p como control endógeno para la normalización de la carga exosomal.....	134
2.4 Significado clínico de los niveles exosomales de las proteínas ITIH1, LOXL2, FBN2 y GSN como potenciales biomarcadores de respuesta a CDDP en CPNM.....	136
2.5 Panel de biomarcadores exosomales de pronóstico en CPNM.....	138
CONCLUSIONES.....	143
BIBLIOGRAFÍA.....	147
ANEXOS.....	163

Resumen

RESUMEN

A pesar del avance de las nuevas terapias personalizadas en cáncer, la quimioterapia basada en platinos sigue siendo el tratamiento estándar en primera línea para el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) y el cáncer de ovario. Sin embargo, continúa existiendo una elevada tasa de pacientes cuya respuesta terapéutica al fármaco fracasa antes de los cinco años del inicio del tratamiento por el desarrollo de resistencia al mismo, por lo que la identificación de perfiles genéticos y biomarcadores moleculares que permitan monitorizar la evolución del paciente y la respuesta al tratamiento es fundamental para adecuar la estrategia terapéutica a cada caso particular. Los exosomas son pequeñas vesículas secretadas por las células que constituyen una pieza fundamental en la comunicación celular a través de la incorporación selectiva de ADN, ARN y proteínas en su interior. Por tanto, los exosomas proporcionan importante información molecular acerca del tumor y constituyen una prometedora fuente de biomarcadores en cáncer. En el presente trabajo hemos abordado la caracterización del contenido de exosomas procedentes de células resistentes a cisplatino, para posteriormente estudiar su implicación en la respuesta al fármaco e identificar nuevos biomarcadores en biopsia líquida, con la finalidad de facilitar el futuro manejo clínico de pacientes oncológicos. La caracterización del microRNoma y proteoma del contenido exosomal mediante el uso de tecnologías de alto rendimiento centradas en secuenciación masiva (NGS) y proteómica dirigida, nos ha permitido identificar un grupo de biomarcadores compuesto por 2 miRNAs y 4 proteínas cuyos niveles permiten segregar a los pacientes de CPNM en función de su respuesta a cisplatino, confiriéndoles un valor pronóstico y predictivo de respuesta. Su valoración conjunta en un modelo de riesgo proporcional de Cox, que combina datos clínicos con dichas variables, identifica un riesgo mayor de *exitus* asociado a los niveles del miR-142-3p y las proteínas GSN e ITIH2, que se incrementa en función del tipo histológico y el sexo del paciente. También hemos identificado por primera vez el miR-novel-55745, no descrito en las bases de datos, con un potencial papel como biomarcador diagnóstico precoz por encontrarse diferencialmente elevado en los exosomas de los pacientes con CPNM. Además, hemos identificado un miARN en el contenido exosomal cuyos niveles se mantienen homogéneos independientemente de la condición analizada, mostrando idoneidad como normalizador universal de los niveles de cualquier miARN de origen exosomal. Por último, en este trabajo hemos generado el primer modelo en 3D de un exosoma basado en la información existente acerca de los componentes y sus concentraciones, que muestra la complejidad de estas vesículas extracelulares y facilita su uso para futuros estudios.

Abstract

ABSTRACT

Despite the improvement in personalized therapies in cancer, platinum-based chemotherapy remains the standard first-line treatment for non-small cell lung cancer (NSCLC) and ovarian cancer. However, there is still a high rate of patients whose therapeutic response fails five years after the start of treatment due to the acquired resistance. Thus, identifying genetic profiles and molecular biomarkers that allow monitoring patients' progress and the response to treatment is essential to adapt the therapeutic strategy to each particular case. Exosomes are small vesicles secreted by cells that represent a fundamental piece in cell communication through their selective cargo of DNA, RNA and proteins. For this reason, exosomes provide important molecular information about the tumor and constitute a promising source of biomarkers in cancer. In the present work we characterized the content of exosomes derived from cisplatin-resistant cancer cells. Besides, we studied the role of exosomes in platinum-based drug response in order to identify new biomarkers in liquid biopsy, which can be easily accessed in the clinical management of oncologic patients. A microRNome and proteome characterization of the exosomal content by using high throughput technologies as next generation sequencing (NGS) and mass spectrometry, allowed us to identify 2 miRNAs and 4 proteins whose levels permitted us to segregate NSCLC patients depending on their response to cisplatin. Their combination with clinical data in a Cox proportional hazard ratio model, identified that exosomal levels of miR-142-3p and proteins GSN and ITIH2 are associated with higher death risk, and this risk increases depending on the histological subtype and patient's sex. We have also identified for the first time miR-novel-55745, a miRNA not previously described in databases, as a potential exosomal biomarker for NSCLC early diagnosis. In addition, we have identified an exosomal miRNA whose levels remain homogeneous regardless the condition analyzed, showing suitability as a universal normalizer for any exosomal miRNA levels. Finally, we have generated the first 3D model of an exosome based on the existing data about the components and their concentrations, which shows the complexity of these extracellular vesicles and facilitates their use on future studies.

Abreviaturas

ABREVIATURAS

3'UTR: Región no Traducible del extremo 3'

Ago2: Argonauta 2

ALK: del inglés, Anaplastic lymphoma kinase

ARNm: ARN mensajero

ASCO: del inglés, American Society of Clinical Oncology

ATCC: del inglés, American Type Culture Collection

CBDCA: *Cis*-diamino(ciclobutano-1,1-dicarboxilato-O,O')platino (II) o Carboplatino

CCC: Carcinoma de Células Claras (del inglés, Clear Cell Carcinoma)

CDDP: *Cis*-diaminodicloroplatino (II) o Cisplatino

CMP: Cáncer Microcítico de Pulmón

CN: Control Negativo

CO: Cáncer de Ovario

CPNM: Cáncer de Pulmón No Microcítico

DAVID: del inglés, Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery

DiD: Sal 1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'- Tetrametil Indo Dicarbocianina, 4-Clorobenzenosulfonato

DNMTs: (del inglés, DNA Methyltransferases)

DT: Desviación Típica

DTT: Ditiotreitól

EC: Carcinoma Endometriode (del inglés, Endometrioid Carcinoma)

ECACC: del inglés, European Collection of Authenticated Cell Cultures

EGFR: del inglés, Epidermal Growth Factor Receptor

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

ESCRT: del inglés, Endosomal Sorting Complexes Required for Transport

ESMO: del inglés, European Society of Medical Oncology

Evs: Vesículas Extracelulares (del inglés, Extracellular Vesicles).

FBN2: Fibrilina 2

FC: del inglés, Fold Change

FIGO: Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia

GSN: Gelsolina

HDACs: (del inglés, Histone Deacetylases)

HGSC: Carcinoma Seroso de Alto Grado (del inglés, High Grade Serous Carcinoma)

HLA: Antígenos Leucocitarios Humanos (del inglés Human Leukocyte Antigen)

IAM: Yodoacetamida

IC₅₀: Concentración inhibitoria 50

ILVs: Vesículas Intraluminales (del inglés, Intraluminal Vesicles)

IR: Índice de Resistencia

ISEV: del inglés, International Society of Extracellular Vesicles

LA: Líquido Ascítico

LC-MS/MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem

LGSC: Carcinoma Seroso de Bajo Grado (del inglés, Low Grade Serous Carcinoma)

LOXL2: Lisil Oxidasa homóloga 2

MC: Carcinoma Mucinoso (del inglés, Mucinous Carcinoma)

MEC: Matriz Extracelular

MET: Microscopía electrónica de transmisión

miARNs: microARNs

MMR: Reparación de apareamientos erróneos (del inglés, Mismatch Repair)

MP: Membrana Plasmática

MRM: del inglés, Multiple Reaction Monitoring

MS: Espectrometría de Masas (del inglés, Mass Spectrometry)

MVBs: Cuerpos Multivesiculares (del inglés, Multivesicular Bodies)

NGS: Secuenciación de alto rendimiento (del inglés, Next Generation Sequencing)

NTA: Análisis de rastreo de nanopartículas (del inglés, Nanoparticle Tracking Analysis)

OMS: Organización Mundial de la Salud

PDB: del inglés, Protein Data Bank

PFA: Paraformaldehído

PI3P: Fosfatidilinositol 3-fosfato

PL: Plasma

Pre-miARN: precursor del miARN

Pri-miARNs: miARNs primarios

RISC: del inglés, RNA-Induced Silencing Complex

SBF: Suero Bovino Fetal

SG: Supervivencia Global

SLP: Supervivencia Libre de Progresión

snRNA: ARN nuclear pequeño

SRM: del inglés, Selected Reaction Monitoring

TCGA: del inglés, The Cancer Genome Atlas

TEM: Dominios Enriquecidos en Tetraspaninas (del inglés, Tetraspanin-Enriched Microdomains)

TFA: Ácido Trifluoroacético

TMB: Carga Mutacional Tumoral (del inglés, Tumor Mutational Burden)

TNM: Tumor Nódulos/ganglios Metástasis

TPM: Tránscritos Por Millón

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial y se estima que en 2018 se diagnosticaron 18,1 millones de casos nuevos siendo la causa de 9,6 millones de muertes a nivel mundial¹. El cáncer de mama, colorrectal, pulmón, cuello uterino y tiroides son los tipos más frecuentes en mujeres (**Figura 1A**), mientras que en hombres los que más incidencia presentan son el cáncer de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado (**Figura 1B**)².

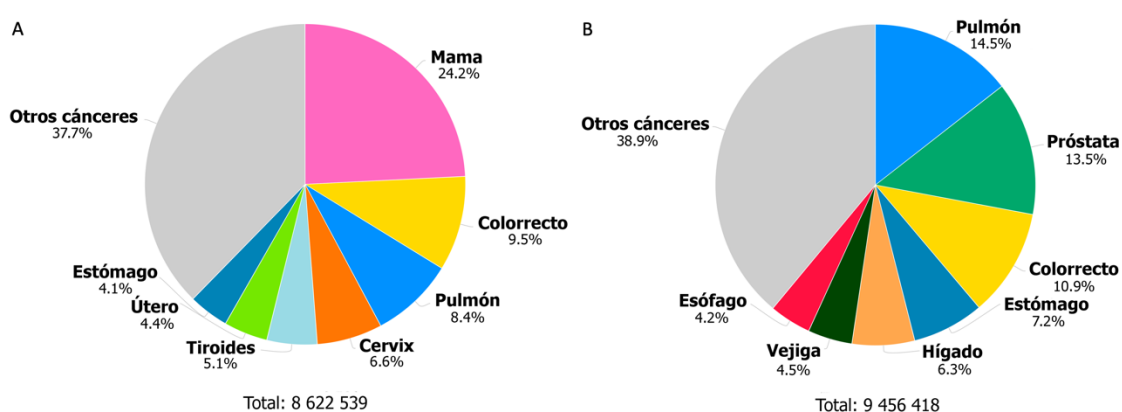


Figura 1. Número estimado de casos nuevos de cáncer en 2018 en todo el mundo en mujeres (A) y hombres (B). Modificada de (<https://gco.iarc.fr/today>)²

El término genérico “cáncer” define un conjunto heterogéneo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo y que se caracterizan por el crecimiento descontrolado de células alteradas más allá de sus límites naturales, pudiendo llegar a invadir partes adyacentes del cuerpo o diseminarse a otros órganos (<https://www.who.int/cancer/en/>).

La aparición de estas células tumorales es el resultado de la alteración de células normales a través de un proceso multifásico y multifactorial que incluye modificaciones genéticas y epigenéticas, como consecuencia de una interacción entre factores genéticos del individuo y la exposición a agentes cancerígenos externos (físicos, químicos y biológicos). En el año 2000, Hanahan y Weinberg describieron por primera vez, las principales capacidades biológicas que, de forma progresiva, son adquiridas por las células que se transforman en tumorales. Dichas capacidades incluyen el mantenimiento de señales de crecimiento y la insensibilidad a señales antiproliferativas, lo que les confiere una inmortalidad replicativa, además de la evasión de la apoptosis, la inducción de angiogénesis, la invasión celular y la capacidad metastásica³. Posteriormente, en 2011, estos mismos autores actualizaron y redefinieron las características

específicas de las células cancerígenas, en base a los nuevos avances realizados en este campo, añadiendo aspectos como la capacidad de modificar el metabolismo celular para sustentar energéticamente la progresión del tumor, la evasión del sistema inmune y la inestabilidad genómica. Además, describieron la existencia de un microambiente tumoral generado por las células durante las distintas fases de la tumorigénesis⁴ (**Figura 2**).



Figura 2. Características de las células tumorales. Modificada de⁴

1.1 Cáncer de Pulmón

Definición y epidemiología

El cáncer de pulmón engloba todas aquellas enfermedades resultantes del crecimiento maligno de células del tracto respiratorio. Desde hace varias décadas es el tipo de cáncer más común, habiéndose diagnosticado 2,1 millones de casos nuevos en 2018 (11,6% del total) y más mortal, con 1,8 millones de muertes causadas en ese mismo año (18,4% del total de defunciones por cáncer) a escala mundial, teniendo una incidencia menor en mujeres que en hombres¹ (**Figura 1A y B**). La elevada mortalidad de este tipo tumoral se debe principalmente a que más del 70% de los casos de cáncer de pulmón se diagnostican en estadios avanzados (III y IV), en los que la enfermedad está diseminada, y a la elevada tasa de resistencia innata o adquirida a los tratamientos con quimioterapia.

El consumo de tabaco sigue siendo la principal causa de aparición del cáncer de pulmón, estimándose que aproximadamente el 71% de las muertes por este tipo de tumor están

relacionadas con el hábito tabáquico. Además, se han descrito algunos otros factores de riesgo como la exposición al amianto, arsénico, radón y otros hidrocarburos aromáticos policíclicos no relacionados con el tabaco⁵, además de la predisposición genética o el padecimiento de enfermedades respiratorias como la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)^{6,7}.

Clasificación

El cáncer de pulmón se divide en dos subtipos principales: cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), que representa entre el 80 y el 90% de los casos y cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico (CMP), que está estrechamente ligado al consumo de tabaco y se caracteriza por su agresividad, por poseer una elevada tasa de crecimiento y una gran capacidad metastásica⁸. Histológicamente, el CPNM se subdivide en tres tipos: adenocarcinoma, escamoso o epidermoide y carcinoma de célula grande⁹ (**Figura 3**). El adenocarcinoma de pulmón es el subtipo más común en no fumadores y se origina a partir de las células que recubren los alvéolos. Se caracteriza por la diferenciación glandular o producción mucinosa, generando patrones acinares, papilares, sólidos o una combinación de todos ellos. El carcinoma epidermoide o escamoso se origina a partir de las células escamosas de los bronquios, muestra una disposición en capas de células y un proceso de queratinización. Junto con el CMP, es el más común entre los pacientes fumadores. Por último, el carcinoma de células grandes incluye los casos de CPNM que, histológicamente, no encajan en los otros dos subtipos⁹.

Uno de los grandes avances de la última década en el diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón es el concepto de medicina personalizada, donde las decisiones terapéuticas se basan en las características histológicas y genéticas específicas del tumor del paciente. Por ese motivo es crucial la determinación histológica del tumor, así como la caracterización molecular del mismo. Aunque durante el proceso de carcinogénesis se producen multitud de cambios genéticos derivados de la inactivación de genes supresores tumorales y de la activación de oncogenes, existen alteraciones frecuentemente asociadas a los diferentes tipos histológicos de CPNM. Dentro del adenocarcinoma se han identificado mutaciones en *EGFR* (del inglés, Epidermal Growth Factor Receptor) y *BRAF*, así como reordenamientos de *ALK* (del inglés, Anaplastic lymphoma kinase) y *ROS1* que además constituyen dianas efectivas de fármacos inhibidores, lo que ha supuesto una revolución en las estrategias terapéuticas de estos pacientes¹⁰. Por otro lado, en el carcinoma epidermoide se identifican más frecuentemente la amplificación del gen *FGFR1*, la pérdida de *PTEN* y mutaciones en *DDR2* o *PIK3CA*^{5,9} (**Figura 3**), aunque, actualmente, no existen fármacos específicos dirigidos a estas alteraciones.

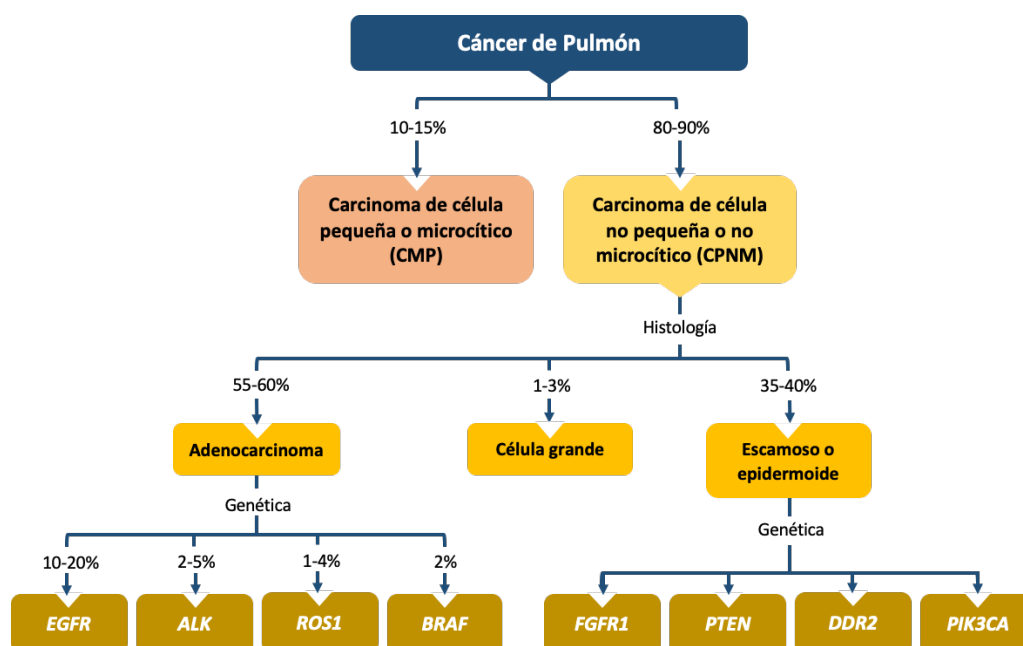


Figura 3. Clasificación histológica y molecular del cáncer de pulmón

Estadificación y tratamiento

La determinación del estadio es una manera consensuada de describir la extensión anatómica del tumor, que resulta fundamental para definir el pronóstico y las opciones terapéuticas del paciente. El sistema de nomenclatura TNM es el más utilizado y se basa en tres parámetros: **T** hace referencia al tamaño del tumor primario, **N** describe la afectación de los ganglios linfáticos regionales y, por último, **M** indica la presencia o ausencia de metástasis a distancia¹¹. Las categorías específicas de TNM que tienen un comportamiento similar se dividen en subgrupos:

T/M	Subcategoría	N0	N1	N2	N3
T1	T1a	IA2	IIB	IIIA	IIIB
	T1b	IA2	IIB	IIIA	IIIB
	T1c	IA3	IIB	IIIA	IIIB
T2	T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB
	T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T3		IIB	IIIA	IIIB	IIIC
T4		IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
M1	M1a	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1b	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1c	IVB	IVB	IVB	IVB

Tabla 1. Clasificación por estadios en cáncer de pulmón.

T1: Tumor ≤ 3 cm; T2: Tumor 3-5 cm; T3: Tumor 5-7 cm; T4: Tumor ≥ 7 cm. N0: Sin afectación ganglionar; N1: Ganglios pulmonares o hiliares ipsilaterales; N2: Ganglios mediastínicos o subcarinales ipsilaterales; N3: Ganglios mediastínicos contralaterales, hiliares o supraclaviculares. M0: Sin metástasis; M1: Metástasis distantes. Modificada de¹¹

De acuerdo con esta clasificación, el tratamiento del cáncer de pulmón varía dependiendo del estadio en el que se encuentre la patología. La siguiente tabla resume los esquemas de tratamiento estándares para cada estadio:

Tabla 2. Esquema de tratamiento en CPNM según el estadio^{5,12}

Estadio	Subcategoría	Tratamiento
I	IA	Resección quirúrgica
	IB	Resección quirúrgica + Quimioterapia en algunos casos
II	IIA	Quimioterapia neoadyuvante + Resección quirúrgica
	IIB	
III	IIIA	Quimioterapia neoadyuvante + Resección quirúrgica
	IIIB	Quimioterapia + Radioterapia
	IIIC	
IV	IVA	Quimioterapia + Radioterapia
	IVB	

Los pacientes con alteraciones específicas en *EGFR*, *ALK* y *ROS1* se tratan con inhibidores tirosina quinasa como Erlotinib o Crizotinib y aquellos con mutaciones en *BRAF* se tratan con inhibidores de *BRAF* como Dabrafetinib o Trametinib. Sin embargo, solo un 15-30% de los pacientes presentan estas mutaciones, por lo que la mayoría reciben quimioterapia basada en derivados del platino (cisplatino y carboplatino) como estándar de tratamiento, en combinación con otros fármacos antitumorales como Pemetrexed, Bevacizumab y Paclitaxel para el adenocarcinoma, o la Vinorelbina para el subtipo escamoso⁵.

Por último, aunque el cáncer de pulmón tradicionalmente se ha considerado como poco inmunogénico por no presentar beneficios en estudios de inmunomodulación con interleucina-2, interferón o citoquinas¹³, el reciente desarrollo de la inmunoterapia con inhibidores de PD-1 ha proporcionado una nueva estrategia de tratamiento en pacientes con cáncer de pulmón en estadios avanzados. Estos pacientes reciben Pembrolizumab cuando presentan niveles de PD-L1 mayores del 50%⁵. Además, estudios realizados recientemente relacionan la existencia de un elevado número de mutaciones somáticas en el tumor, lo que se conoce como carga tumoral (TMB, del inglés, Tumor Mutational Burden), con una mayor activación del sistema inmune y por lo tanto una mejor respuesta del paciente al tratamiento con inmunoterapia¹⁴⁻¹⁶. Ensayos clínicos como el CheckMate 227 ya plantean el uso del TMB como biomarcador para identificar pacientes que puedan beneficiarse del tratamiento con inmunoterapia¹⁷.

1.2 Cáncer de Ovario

Epidemiología

El cáncer de ovario es el más letal dentro de los de tipo ginecológico, ya que la gran mayoría de los casos se diagnostican en estadios avanzados y la supervivencia relativa a 5 años es solo del 29%. En 2018 se diagnosticaron 295.000 nuevos casos en todo el mundo y se registraron 185.000 muertes^{1,18}. En el cáncer de ovario, uno de los factores de riesgo más importantes son los antecedentes familiares de la enfermedad. Las mutaciones con alta penetrancia en *BRCA1* y *BRCA2* incrementan el riesgo de padecer cáncer de ovario, representando la gran mayoría de casos hereditarios de la enfermedad y el 10-15% de todos los casos. Además, se han descrito factores de riesgo hormonales y reproductivos, así como factores ambientales y de estilo de vida, relacionados con el desarrollo del cáncer de ovario¹⁹.

Clasificación

Los tumores de ovario se originan a partir de tres tipos de células en este órgano: células epiteliales, células del estroma y células germinales. El 90% de los carcinomas ováricos son de origen epitelial²⁰. El carcinoma epitelial de ovario es una enfermedad heterogénea que se divide en distintos subtipos histológicos que presentan diferencias en su origen celular, lesiones precursoras, alteraciones moleculares y pronóstico. Se distinguen 5 histotipos principales: carcinoma seroso de alto grado (HGSC; 70%), carcinoma seroso de bajo grado (LGSC; <5%), carcinoma endometriode (EC; 10%), carcinoma de células claras (CCC; 10%) y carcinoma mucinoso (MC; 3%)^{21,22}. Las neoplasias serosas de alto y bajo grado se originan a partir del epitelio de las trompas de Falopio, mientras que el origen del CCC y EC se asocia con la endometriosis. El MC tiene su origen en las células de la unión trompa-mesotelio^{23,24} (**Figura 4**).

En cada tipo histológico se han descrito alteraciones genéticas frecuentes, encontrándose típicamente en HGSC mutaciones en *p53* y *BRCA1/2*. Por el contrario, el LGSC no se relaciona con estas mutaciones pero sí se encuentran frecuentemente alteraciones en *KRAS* y *BRAF*^{25,26}. El CE y el CCC, por su relación con la endometriosis, se relacionan con mutaciones en el gen *ARID1A*. El CE además muestra alteraciones en *PTEN* y el CCC es positivo para HNF1-β en más del 90% de los casos²⁷. Por último, el MC presenta frecuentemente alteraciones en *KRAS* y *HER2*²⁸ (**Figura 4**).

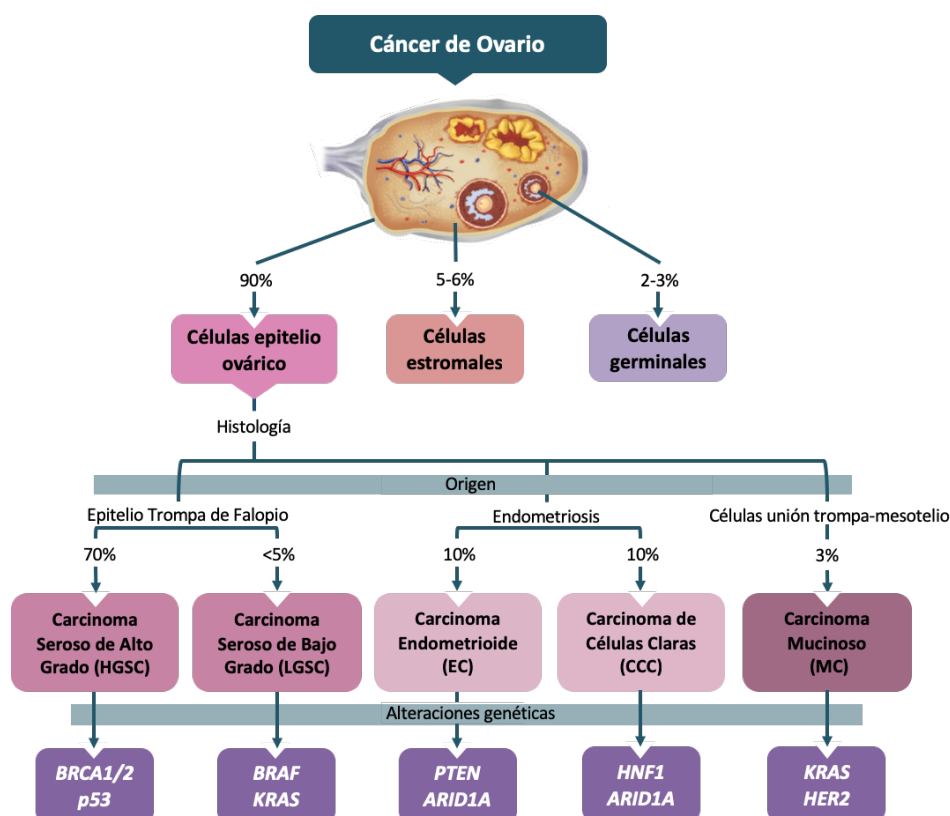


Figura 4. Clasificación histológica y molecular del cáncer de ovario

Estadificación, diferenciación y tratamiento

La determinación del estadio, como en el cáncer de pulmón, es clave para determinar la extensión anatómica del tumor y así definir la estrategia terapéutica a seguir. En el cáncer de ovario se utiliza la exploración quirúrgica para estadificar la enfermedad. En base a la clasificación establecida por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) del 2014 se distinguen los siguientes estadios:

Tabla 3. Clasificación FIGO por estadios en cáncer de ovario y tratamiento²⁹

Estadio	Localización	Tratamiento
I	Limitado a los ovarios	Cirugía citorreductora + Quimioterapia (si es alto grado)
II	Uno o ambos ovarios con extensión pélvica	Cirugía citorreductora + Quimioterapia
III	Uno o ambos ovarios con metástasis peritoneales y/o ganglionares regionales	Quimioterapia neoadyuvante + Cirugía citorreductora
IV	Uno o ambos ovarios con metástasis a distancia	Quimioterapia + Cirugía de intervalo + Quimioterapia

Otro criterio para definir distintos niveles de malignidad, que ayuda a la toma de decisiones terapéuticas, es el grado de diferenciación celular de las células tumorales. Cuando las células tumorales son similares a las del tejido sano, el tumor se considera como diferenciado

o de bajo grado y el pronóstico es más favorable. Se establecen los siguientes grados de diferenciación³⁰:

- GX: grado no evaluable
- G1: bien diferenciado
- G2: moderadamente diferenciado
- G3: pobremente diferenciado

En el manejo del cáncer de ovario, la cirugía de citorreducción es siempre la primera opción de tratamiento, exceptuando los casos no operables desde el inicio por criterios de irresecabilidad asociados a la extensión o voluminosidad de las metástasis o por contraindicación quirúrgica formal, ya que los dos factores que más se relacionan con la supervivencia son el tamaño del tumor residual tras la cirugía y la sensibilidad a la quimioterapia³¹. La citorreducción puede ser completa, cuando no existe evidencia macroscópica de tumor residual, óptima, si el tamaño del tumor es <1 cm, o subóptima, cuando el tamaño es ≥ 1 cm. En aquellas pacientes no susceptibles de citorreducción primaria, se administra quimioterapia neoadyuvante para disminuir el tamaño del tumor e intentar una posterior resección quirúrgica. En los casos en los que si se haya podido realizar una citorreducción se administra quimioterapia adyuvante. En ambos casos, el esquema de quimioterapia utilizado se basa en una combinación de compuestos derivados del platino (cisplatino o carboplatino) con paclitaxel²⁹.

La respuesta inicial a la quimioterapia basada en platinos en el cáncer de ovario se puede clasificar en tres grupos: refractario, resistente y sensible al platino. En el grupo refractario se engloban las pacientes que no responden y muestran progresión durante el curso de la terapia. Por otro lado, la resistencia al platino se define por la recaída en menos de 6 meses tras la quimioterapia³². Según el tipo histológico de cáncer de ovario, se han descrito distintas quimiosensibilidades, siendo el HGSC y el EC los que mayor respuesta inicial presentan y el MC y CCC los que menor²¹.

La disponibilidad de terapias dirigidas en cáncer de ovario es todavía muy limitada, aunque hoy en día numerosos estudios se centran en este objetivo, habiéndose conseguido la aprobación del fármaco antiangiogénico Bevacizumab en combinación con el esquema habitual de platino + paclitaxel³³. Además, se han realizado estudios clínicos que han demostrado que los tumores deficientes en BRCA1/2 son sensibles a inhibidores de la PARP como Olaparib en combinación con derivados del platino³⁴.

1.3 Cisplatino

Mecanismo de acción

El cisplatino (cis-diaminodicloroplatino II o CDDP) es un agente alquilante derivado del platino que se utiliza como tratamiento estándar antitumoral en múltiples tumorales sólidos, como el cáncer de pulmón, ovario, testículo, o cabeza y cuello. El CDDP es un compuesto inorgánico inerte que se activa en el citoplasma de la célula a través de una serie de reacciones que sustituyen uno o ambos grupos *cis*-cloro por moléculas de agua. El producto que se genera es un potente electrófilo que reacciona con los sitios nucleofílicos del ADN, ARN y las proteínas. En el ADN, el cisplatino reacciona con los sitios N7 de las purinas formando aductos que consisten en uniones cruzadas guanina-guanina o adenina-guanina inter o intracatenarias. Estos aductos provocan que al ADN se curve y la hélice se desenrole, provocando la activación de múltiples vías de señalización que, según la magnitud del daño, terminan induciendo la reparación del ADN o la muerte celular por apoptosis^{35–37}. Dentro de la célula, se produce un aumento del estrés oxidativo incrementándose los niveles de radicales libres y la activación de las vías de respuesta al mismo³⁸.

Resistencia a cisplatino

Una de las mayores limitaciones que tiene el uso del cisplatino como agente antitumoral es la resistencia al fármaco que muchos de los pacientes desarrollan, conduciendo a la recaída de la enfermedad y el fracaso del tratamiento. Dicha resistencia responde a un mecanismo de autodefensa celular, adquirido o innato, que consigue evitar los efectos tóxicos del fármaco quimioterapéutico. Existen distintos mecanismos que contribuyen a la aparición de resistencia a cisplatino, pero normalmente es necesaria la activación de más de uno de ellos para que aparezca, es decir, se trata de un fenómeno multifactorial. Estos mecanismos pueden actuar a distintos niveles del proceso de acción del fármaco: (1) disminución de la concentración intracelular del compuesto, a través de modificaciones en los transportadores de membrana; (2) inactivación del cisplatino o imposibilidad de alcanzar el ADN, debido al incremento de moléculas implicadas en su detoxificación como glutatión o metaloproteínas; (3) aumento de la reparación del ADN mediante mecanismos de escisión de nucleótidos (NER) o la reparación de apareamientos erróneos (MMR); (4) insensibilidad celular ante señales de detención del ciclo celular y de apoptosis; y (5) activación de factores de transcripción que inducen la proliferación celular o de proteínas antiapoptóticas, así como de DNMTs (del inglés, DNA Methyltransferases) y HDACs (del inglés, Histone Deacetylases) que modifican epigenéticamente la expresión de numerosos genes^{36,39–42}.

2. Vesículas extracelulares y comunicación celular

La comunicación celular es la capacidad que tienen todas las células, procariotas y eucariotas, de intercambiar información en forma de señales fisicoquímicas, con el exterior y con otras células. Esa comunicación celular es esencial para la coordinación y mantenimiento de la homeostasis en los sistemas multicelulares y puede medirse a través del contacto directo entre células o mediante la transferencia de moléculas secretadas como factores de crecimiento, neurotransmisores, hormonas o citoquinas. Estas moléculas son liberadas por la célula y pueden actuar en zonas próximas, incluso en la propia célula secretora, o en zonas distantes del organismo viajando a través de fluidos biológicos⁴³.

Esta ha sido la concepción clásica de la comunicación celular, sin embargo, en las últimas décadas, se ha descrito un tercer mecanismo que involucra el intercambio de vesículas extracelulares (Evs, del inglés, Extracellular Vesicles). Además de la liberación de vesículas secretoras por parte de células especializadas, como ocurre por ejemplo en la sinapsis neuronal con la secreción de neurotransmisores a la hendidura sináptica, todas las células, eucariotas y procariotas, son capaces de secretar varios tipos de vesículas membranosas denominadas genéricamente como vesículas extracelulares^{44,45}. Estas EVs son utilizadas por las células como vehículos de información para intercambiar diferentes tipos de moléculas como proteínas, ácidos nucleicos o lípidos, tanto en procesos fisiológicos normales, como a consecuencia de eventos patológicos⁴⁶. Dependiendo del proceso de biogénesis y su tamaño, las EVs se pueden clasificar en dos grupos principales: **exosomas** (entre 30 y 150 nm) y **microvesículas** (entre 0.1 y 1 μm)⁴⁵ (Figura 5).

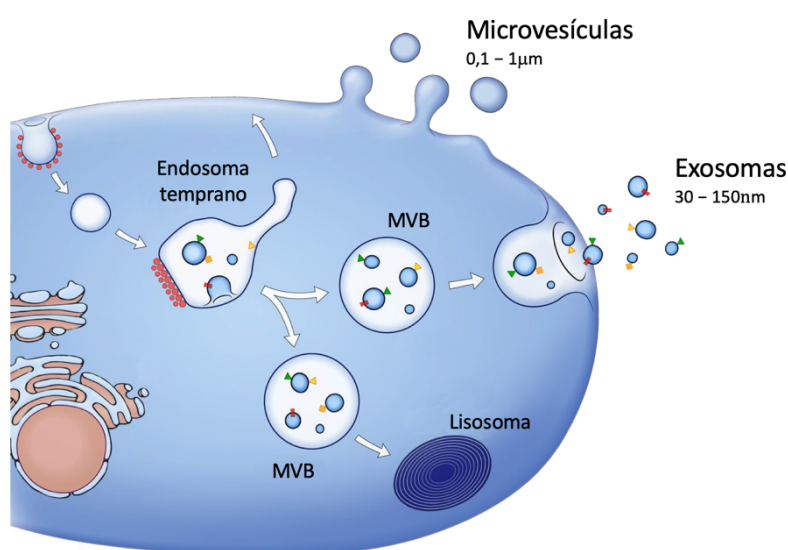


Figura 5. Representación esquemática de la secreción de microvesículas y exosomas.

MVB: Cuerpo Multivesicular. Modificada de⁴⁷

2.1 Exosomas

Definición y descubrimiento

Los exosomas son vesículas de bicapa lipídica de entre 30 y 150 nm de diámetro que se originan a partir de los endosomas y se liberan al exterior a través de la fusión de los cuerpos multivesiculares (MVBs, del inglés, Multivesicular Bodies) con la membrana plasmática (MP) (**Figura 5**). Estas nanovesículas fueron descritas por primera vez en 1983, cuando dos grupos de investigación que estudiaban la maduración de los reticulocitos a glóbulos rojos, observaron que en el proceso se producía una pérdida de receptores de transferrina. Al estudiar el mecanismo por el que se perdían dichos receptores, con microscopía electrónica, descubrieron los MVBs y cómo estos expulsaban las vesículas intraluminales al exterior celular^{48,49} (**Figura 6A y B**). En 1987 la autora de uno de los trabajos, Rose M. Johnstone, acuñó el término “Exosomas”⁵⁰.

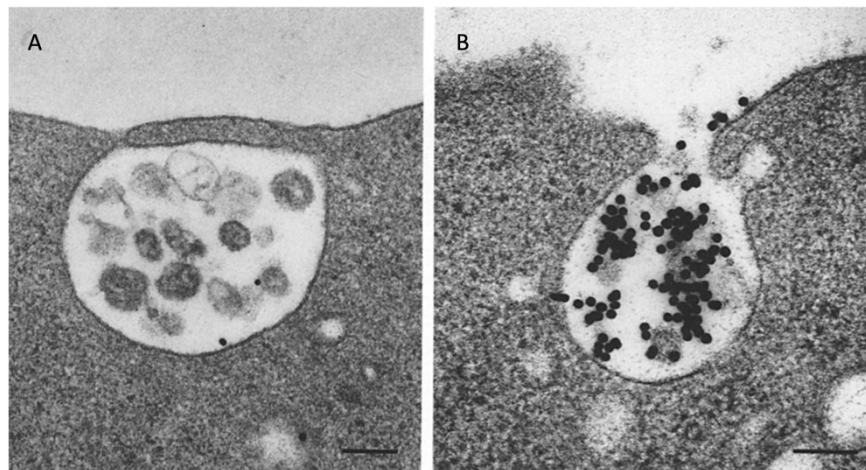


Figura 6. Exosomas en el interior de cuerpos multivesiculares (MVB) procedentes de reticulocitos visualizados con microscopía electrónica. (A) MVB en el citoplasma y (B) fusionándose con la MP⁴⁹

Dadas las circunstancias en las que se descubrieron por primera vez los exosomas, inicialmente se consideraron como un mecanismo de eliminación de desechos celulares. Sin embargo, a mediados de los 90, se descubrió que los linfocitos B⁵¹ y las células dendríticas⁴³ también secretaban exosomas y se postuló que podían estar implicados en la regulación de la respuesta inmune. A partir de ahí, en estas últimas dos décadas, se han realizado numerosos estudios que ponen de manifiesto la secreción de exosomas en numerosos tipos celulares y sus implicaciones en la comunicación intercelular tanto en contextos fisiológicos como patológicos⁵². Además, al ser liberados por todos los tipos celulares del organismo, los exosomas se pueden encontrar en los diferentes fluidos biológicos como la sangre, la orina, la saliva, el líquido ascítico o el líquido cefalorraquídeo, entre otros⁴⁷.

Algunos de los procesos fisiológicos en los que se ha descrito la participación de los exosomas incluyen la regulación de la respuesta inmune^{53,54}, coagulación sanguínea⁵⁵, diferenciación de células madre⁵⁶, regeneración tisular y angiogénesis⁵⁷, desarrollo del sistema nervioso central^{58,59} o procesos relacionados con el embarazo^{60,61}. Asimismo, los exosomas se han asociado con diversas patologías entre las que cabe destacar enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson⁶² o Alzheimer⁶³, enfermedades infecciosas⁶⁴, cardiovasculares⁶⁵ y, especialmente, el cáncer⁶⁶. Su papel en el cáncer ha adquirido especial relevancia en los últimos años, ya que las células tumorales liberan una gran cantidad de exosomas en comparación con las células normales⁶⁷. Los exosomas están implicados en numerosos procesos que subyacen a la progresión del cáncer, incluyendo proliferación celular, respuesta inflamatoria, angiogénesis, migración e invasión celular, evasión del sistema inmune, transición epitelio-mesénquima y desarrollo del nicho premetastásico⁶⁸⁻⁷¹.

Biogénesis, secreción y captación

Los exosomas son vesículas intraluminales (ILVs, del inglés, IntraLuminal Vesicles) que se generan mediante invaginaciones de la membrana del endosoma temprano en su proceso de maduración hacia MVB. Tras su formación, existen poblaciones de MVBs que toman la vía lisosomal fusionándose con los lisosomas y degradando así su contenido, mientras que otras poblaciones de MVBs, enriquecidas en colesterol, continúan la vía de secreción fusionándose con la MP de la célula y liberando las ILVs o exosomas al medio extracelular^{47,72} (**Figura 5**).

Dentro de los mecanismos propuestos para la formación de los MVBs podemos distinguir entre los dependientes y los independientes del complejo ESCRT (del inglés, Endosomal Sorting Complexes Required for Transport). El complejo ESCRT constituye una maquinaria proteica evolutivamente conservada cuya función es constreñir y escindir las membranas desde el interior. Este mecanismo se utiliza no solo en la formación de los MVBs, sino también en la citocinesis, la gemación de los virus o en la eliminación de sinapsis neuronales, entre otros procesos⁷³⁻⁷⁵. En el caso de la formación de los MVBs, este complejo tiene un doble papel, ya que se encarga de mediar la captación del cargo en la membrana endosomal y posteriormente de la formación de la vesícula. El complejo está compuesto por unas treinta proteínas que se ensamblan en 4 subcomplejos: ESCRT-0, I, II y III; y sus proteínas asociadas⁷⁶ (**Figura 7**).

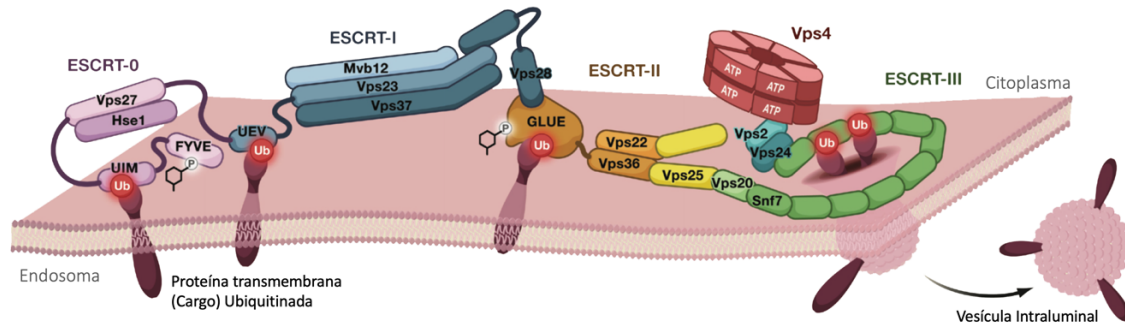


Figura 7. Componentes del complejo ESCRT. Modificada de⁷⁷

El proceso se inicia mediante la interacción de ESCRT-0 con el fosfolípido fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) presente en la membrana del endosoma. Este complejo, junto con ESCRT-I y ESCRT-II, reconocen y reclutan proteínas ubiquitinadas, que formarán parte del contenido de las vesículas, secuestrándolas en la membrana endosomal. Por último, ESCRT-III, con la ayuda de la ATPasa VPS4, se encarga de la formación y escisión de las ILVs.

Sin embargo, existen evidencias de que los MVBs pueden formarse de manera independiente al complejo ESCRT⁷⁸. Uno de estos mecanismos está relacionado con las tetraspaninas, que son proteínas de membrana muy enriquecidas en los exosomas y que a través de su interacción con lípidos y otras proteínas transmembrana, se organizan en dominios enriquecidos en tetraspaninas (TEM, del inglés, Tetraspanin-Enriched Microdomains)⁷⁹. Tetraspaninas como CD63, CD9 y CD81 se han relacionado con la secreción de exosomas en distintos tipos de células^{80,81}. El otro mecanismo independiente de ESCRT más aceptado es el que involucra a la esfingomielinasa, que es la enzima que hidroliza la esfingomielina en ceramida. Este lípido es un componente muy abundante en la membrana de los exosomas y se ha visto que induce la invaginación de la membrana en la formación de las ILVs⁸². Por lo tanto, existen distintos mecanismos que actúan de manera simultánea y complementaria en la formación de los MVBs, permitiendo la introducción de cargos diversos dentro de los exosomas.

Una vez se han formado los MVBs, pueden seguir la vía de degradación lisosomal, si se fusionan con lisosomas, o la vía de secreción, si se fusionan con la MP. En ambos casos se requiere un primer proceso de transporte y un segundo proceso de fusión, pero los efectores de las dos vías son distintos, así como la composición lipídica y proteica de la membrana de los MVBs. Las proteínas implicadas en el proceso pertenecen a la familia de las GTPasas monoméricas Rab. Se ha descrito que Rab27A y Rab27B son esenciales en la regulación del transporte de los MVBs a través de la interacción con el citoesqueleto y en el posterior

acoplamiento con la MP para promover la fusión⁴⁵. El mecanismo de fusión con la membrana está mediado por la familia de proteínas SNAREs y se ha visto regulado por los niveles de Ca^{2+} intracelular⁵². Además se ha descrito que factores externos como el estrés oxidativo, pueden estimular la secreción de exosomas.

Por último, una vez son liberados los exosomas al espacio extracelular, estos son capaces de llegar a la célula receptora, introducir su contenido y provocar la activación de rutas de señalización o alteraciones en los niveles de ciertas moléculas dentro de la célula, lo que puede dar lugar a cambios fenotípicos que afectarán su estado fisiológico o patológico⁴⁵. Esa entrada de información en la célula receptora a través de los exosomas se puede llevar a cabo por diferentes vías: (1) fusión directa con la MP, (2) internalización de la vesícula por diferentes tipos de endocitosis o (3) unión a receptores de la superficie de la MP, lo que conlleva la activación de rutas de señalización intracelulares⁴⁷ (**Figura 8**).

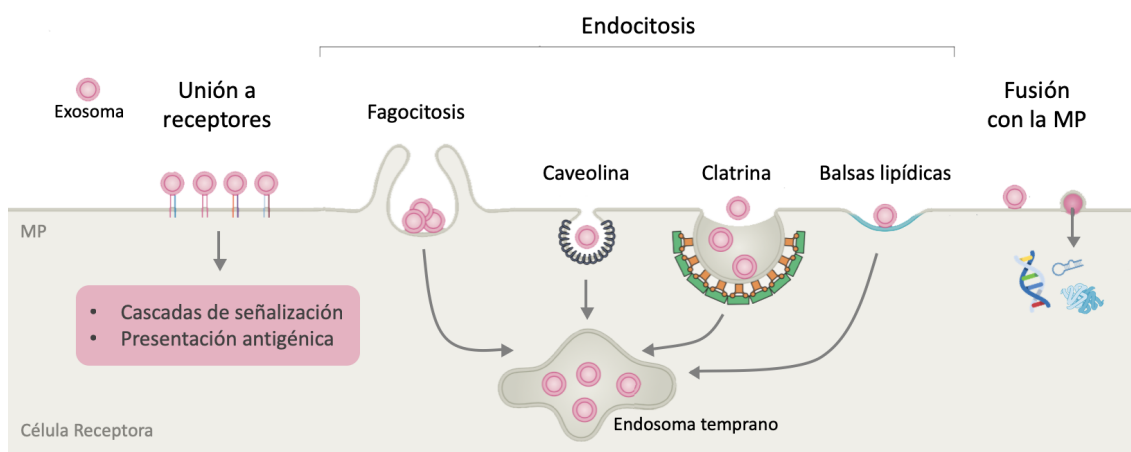


Figura 8. Destino de los exosomas en la célula receptora. En la célula receptora, que puede ser la propia célula productora, los exosomas se unen a receptores de membrana, desencadenando vías de señalización intracelular. Los exosomas también pueden ser internalizados por diferentes mecanismos de endocitosis y seguir la vía endosómica canónica. Por último, los exosomas pueden liberar su contenido fusionándose directamente con la MP. Modificada de⁴⁵

Composición molecular

El contenido o cargo de los exosomas depende del tipo de célula, de su contexto fisiológico y de los estímulos que promuevan su secreción⁸⁴. Por tanto, no se trata de una mera muestra aleatoria del contenido celular, sino que la célula incluye de manera selectiva ciertas moléculas en el interior de los exosomas. El reciente desarrollo de las técnicas masivas de análisis ha permitido estudiar más ampliamente el contenido proteómico, lipidómico, genómico

y transcriptómico de los exosomas, poniendo de manifiesto que existen ciertos componentes que son comunes a todos los exosomas, independientemente de su origen. ExoCarta⁸⁵ es una base de datos que recoge información relativa a proteínas, ARN y lípidos de los estudios realizados en exosomas. Sin embargo, a pesar de la cantidad de datos relativos a la composición exosomal que se dispone, hasta la fecha no se ha desarrollado ningún modelo visual a escala que integre dichos componentes en una correcta concentración relativa. Esto se debe a que existen muy pocos estudios que hayan definido el ratio de enriquecimiento de los componentes moleculares de los exosomas con respecto a la célula secretora⁸⁶⁻⁸⁸.

A continuación, se describen los principales componentes moleculares comunes a todos los exosomas (**Figura 9**):

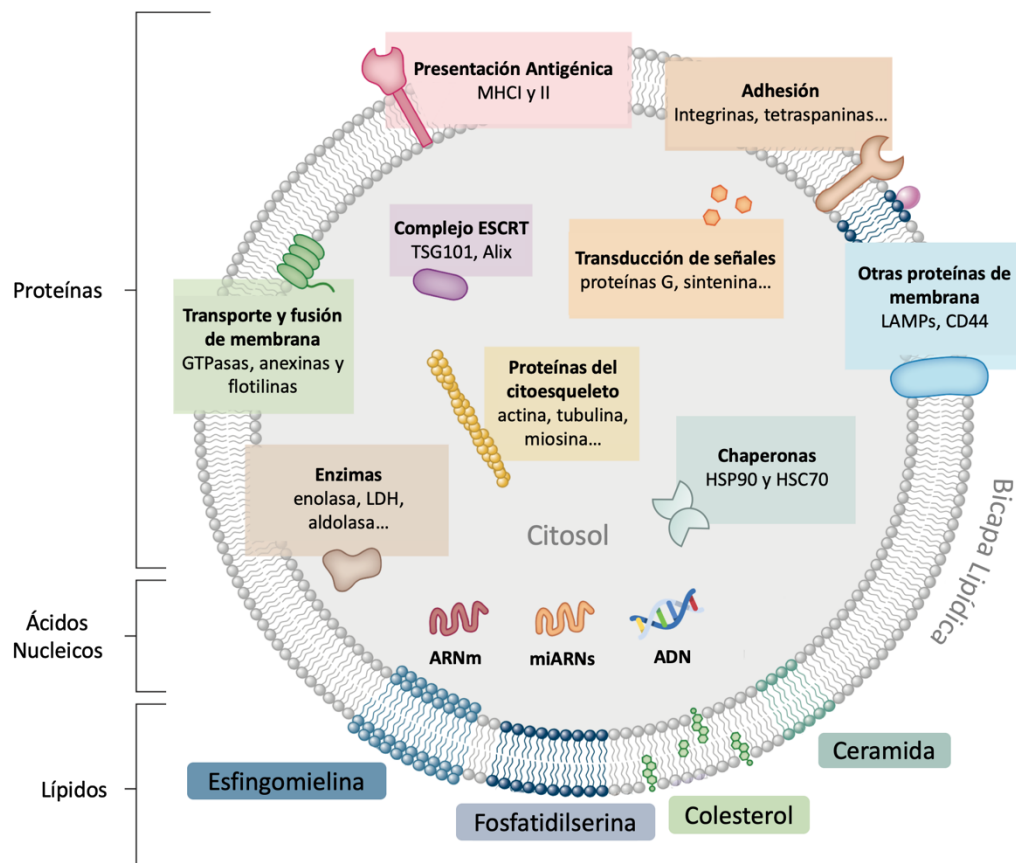


Figura 9. Composición molecular de los exosomas. Modificada de⁵²

- **Lípidos.** Es el componente menos estudiado dentro de los exosomas. Sin embargo, se ha observado que el contenido lipídico de estos es distinto al de la célula de origen, estando las nanovesículas enriquecidas en esfingomielina, fosfatidilserina y ceramida. Por el contrario, contienen un menor porcentaje de fosfatidilcolina que las células de las que proceden⁸⁹.

Además, los ácidos grasos de las membranas de los exosomas son principalmente saturados y monoinsaturados^{82,90-92}.

- **Proteínas.** El contenido proteico de los exosomas se ha estudiado extensamente desde su descubrimiento. Debido a su origen endosomal, todos los exosomas contienen proteínas relacionadas con el proceso de transporte y fusión de membrana (GTPasas como Rab5a, Rab27a y b, anexinas y flotilinas), proteínas de adhesión (integrinas y tetraspaninas como CD81, CD63 y CD9) y proteínas del complejo ESCRT (Alix y TSG101). En cuanto a proteínas citosólicas, los exosomas comúnmente contienen chaperonas (HSP90 y HSC70), enzimas (enolasa, lactato deshidrogenasa, ácido graso sintasa...), proteínas de transducción de señales (proteínas G, sintenina, etc) y proteínas del citoesqueleto (actina, tubulina, miosina, etc). Además, los exosomas liberados por las células presentadoras de antígenos contienen proteínas MHC I y II en su membrana^{47,52,53,93}. Algunas de estas proteínas, al encontrarse específicamente en los exosomas, se utilizan como marcadores exosomales.
- **Ácidos nucleicos.** Además de las proteínas, los ácidos nucleicos son el otro componente exosomal más estudiado. De hecho, el descubrimiento de que los exosomas contenían ARN mensajero (ARNm) y microARNs (miARNs) por parte de Valadi et al. en el año 2007 supuso una revolución en el campo de las vesículas extracelulares. En su estudio vieron cómo el ARNm contenido en los exosomas de mastocitos de ratón se transfería a células de origen humano, en las que, posteriormente, encontraron proteínas de ratón. Los resultados indican no solo que existe una transferencia de ARNm a través de los exosomas sino que dicho ARNm es funcional y puede ser traducido a proteína en la célula receptora⁹⁴. Asimismo, estudios recientes han demostrado la funcionalidad de los miARNs en las células receptoras, en las que son capaces de inhibir la expresión de sus genes diana⁹⁵⁻⁹⁷. Aunque se ha descrito que los miARNs exosomales son principalmente pre-miARNs⁹⁸, algunos investigadores los han identificado formando complejo con la proteína Argonauta 2 (Ago2) dentro de los exosomas^{99,100}. Sin embargo, aún no está claro si la mayoría de los miARNs circulantes se encuentran dentro de los exosomas¹⁰¹ o, por el contrario, sólo una pequeña porción de ellos están dentro de estas nanovesículas^{102,103}. Además de los ARNm y los miARNs, se ha descrito la presencia de fragmentos de ARNt, ARNr, ARNs no codificantes de pequeño tamaño (Y-ARN y siARN)¹⁰⁴ y ARN no codificantes largos¹⁰⁵. Por último, se han encontrado evidencias de que los exosomas pueden contener fragmentos de ADN genómico de doble cadena (desde 35pb hasta 17kb) que representan todos los cromosomas¹⁰⁶⁻¹⁰⁹ y que es capaz de transcribirse a ARNm que, posteriormente, se traducirá a proteína en las células receptoras, afectando su función fisiológica¹⁰⁶. Además, estudios recientes señalan la presencia de ADN mitocondrial¹¹⁰ en los exosomas.

2.2 miARNs y proteínas exosomales en cáncer

Los microARNs (miARNs o miRs) son una familia de ARN no codificantes pequeños (18-25 nucleótidos) implicados en la regulación de la expresión génica a través de la hibridación específica con ARNm complementarios, inhibiendo su traducción a proteínas. Los miARNs se transcriben como miARNs primarios (pri-miARNs) a partir de su secuencia en el ADN, proceso mediado principalmente por la ARN polimerasa II. Después, el pri-miARN es procesado por una ARNasa III específica conocida como Drosha, que genera una horquilla de unos 60-100 nucleótidos denominada precursor del miARN (pre-miARN). A continuación, el pre-miARN es exportado al citoplasma a través de un transportador de membrana, la Exportina-5. Una vez allí, la ARNasa III Dicer corta la horquilla generando un ARN de doble cadena de unos 18-25 nucleótidos. El complejo RISC (del inglés, RNA-Induced Silencing Complex) selecciona una de las dos cadenas en función de la estabilidad del apareamiento, provocando la degradación de la otra. Por último, el miARN generado, busca la zona de homología en la región no traducible del extremo 3' (3'UTR) de un ARNm, para unirse e impedir su traducción o favorecer su degradación (**Figura 10**). Cada ARNm puede estar regulado por diferentes miARNs y un miARN puede actuar sobre cientos de ARNm candidatos^{111,112}.

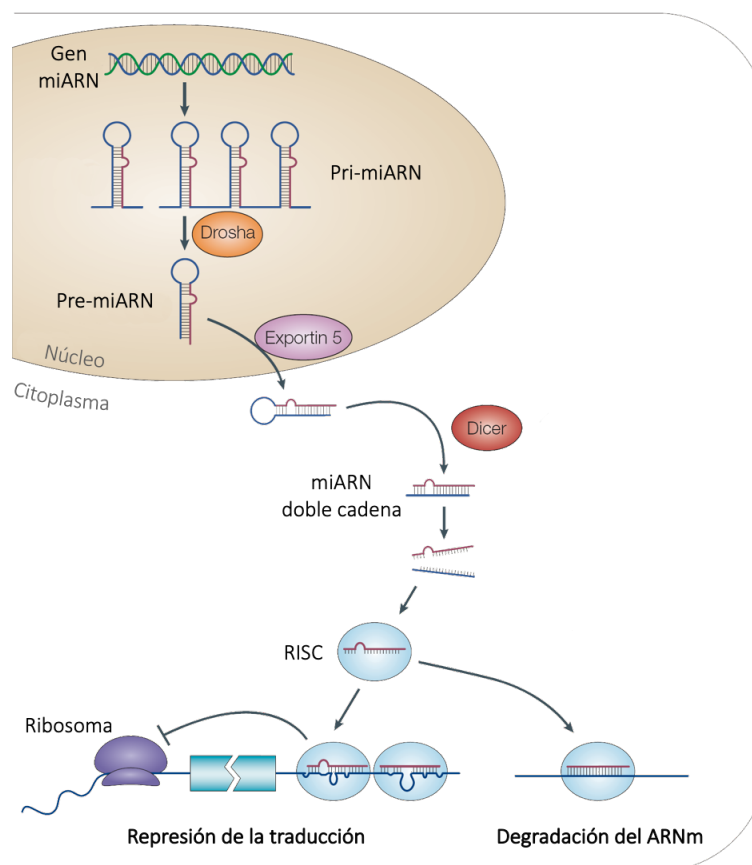


Figura 10. Biogénesis de los miARNs. Modificada de¹¹³

La primera vez que se describió la relación entre miARNs y cáncer fue en el año 2002, definiéndose como miARNs supresores tumorales aquellos cuya expresión se encuentra disminuida en cáncer¹¹⁴. Por el contrario, los miARNs oncogénicos son aquellos que se encuentran sobreexpresados en cáncer, activando procesos como la proliferación y supervivencia celular o la angiogénesis¹¹⁵. Los estudios centrados en su implicación en cáncer han aumentado desde entonces, cobrando gran interés la utilización de los miARNs circulantes como biomarcadores^{116–118}. A partir del descubrimiento en el año 2007 del papel de estos ARNs de pequeño tamaño como mecanismo de comunicación vía exosomal⁹⁴, se ha centrado el interés en el potencial de los miARNs exosomales como biomarcadores en cáncer, por su mayor accesibilidad e integridad que los miARNs circulantes^{119,120}, así como su enriquecimiento en la sangre de los pacientes con cáncer⁶⁷. La utilidad de los miARNs exosomales como marcadores diagnósticos y pronósticos se ha descrito en diferentes tipos tumorales como cáncer de ovario, pulmón o cáncer gástrico^{117,121–123}.

Además de miARNs, las proteínas exosomales también han adquirido gran importancia como biomarcadores en cáncer, debido a que constituyen moléculas bioactivas capaces de influir fisiológicamente en la célula receptora y viajan protegidas de proteasas y otras enzimas gracias a la bicapa lipídica exosomal. De hecho, se ha descrito que tienen ventajas como marcadores serológicos sobre las proteínas detectadas directamente en sangre, ya que, por ejemplo, proteínas como PKG1 y NFX1 únicamente se detectan en exosomas circulantes¹²⁴. En cuanto a las proteínas oncogénicas exosomales, la proteína GPC1 se encontró específicamente enriquecida en exosomas de pacientes con cáncer de páncreas en comparación con pacientes sin patología tumoral¹²⁵. De la misma forma, los niveles de EDIL3 son significativamente más altos en los pacientes con cáncer de mama que en individuos controles y se reducen drásticamente después de la resección del tumor¹²⁶. Además, también se ha descrito que los exosomas tumorales exhiben integrinas en su membrana, capaces de generar nichos premetastásicos en órganos específicos¹²⁷.

Resistencia a quimioterapia

Aunque la implicación de los miARNs y proteínas exosomales en cáncer se ha estudiado extensamente en los últimos años, su papel en el desarrollo de resistencia a fármacos antitumorales empieza a estudiarse y aún está por explorar en profundidad. Se han propuesto diferentes mecanismos a través de los cuales las células tumorales adquieren resistencia a quimioterapia. Un estudio realizado en cáncer de mama muestra cómo las células resistentes a Adriamina y Docetaxel transfieren dicha resistencia a células sensibles mediante los miARNs

exosomales miR-100, miR-222, miR-30a y miR-17¹²⁸. Por otro lado, se ha descrito que el miR-21 exosomal está implicado en la resistencia a cisplatino en cáncer gástrico¹²⁹ y los miARNs 100-5p y 146a-5p en cáncer de pulmón^{130,131}. Otro mecanismo de resistencia consiste en la eliminación del fármaco antes de ejercer su acción. En este sentido, se ha visto cómo células de cáncer de mama resistentes a Mitoxantrona son capaces de expulsar dicho fármaco en el interior de los exosomas, evitando así su acción antineoplásica¹³². Por último, algunos estudios relacionan el desarrollo de resistencia a Paclitaxel con la transferencia de proteínas exosomales como la survivina en cáncer de mama¹³³ o anexina A3 en resistencia a cisplatino en cáncer de ovario¹³⁴. Sin embargo, en relación con el cáncer de pulmón, la implicación de las proteínas exosomales en quimiorresistencia es aún prácticamente desconocida y la implicación de los miARNs exosomales está actualmente en estudio.

Dado el escaso conocimiento actual sobre la implicación de los miARNs y proteínas exosomales en la resistencia a cisplatino, no se ha identificado hasta la fecha ningún candidato con un papel relevante que pueda ser utilizado en la futura práctica clínica. Esto puede deberse a que la mayoría de los estudios publicados al respecto se centran en la caracterización del contenido exosomal pero muy pocos cuentan con una validación traslacional. Además, en los pocos casos en los que se reportan datos con cohortes de validación en pacientes, existe una falta de métodos robustos de normalización específicos para el análisis del contenido exosomal.

Hipótesis y Objetivos

HIPOTESIS

Los exosomas contienen moléculas con actividad biológica propia, como microARNs y proteínas, capaces de inducir cambios fisiológicos en las células receptoras. Además, se sabe que los tumores metastásicos presentan, con elevada frecuencia, resistencia adquirida al tratamiento con quimioterapia.

Por ello, la hipótesis del presente trabajo se basa en que las células resistentes a quimioterapia contienen microARNs y proteínas que se excretan selectivamente a través de los exosomas, pudiendo, de manera individual o conjunta, favorecer el desarrollo de resistencia al tratamiento mediante su diseminación sistémica.

OBJETIVOS

El objetivo global de este trabajo es la caracterización del contenido exosomal para la identificación de nuevos biomarcadores de respuesta al tratamiento con derivados del platino en pacientes con cáncer de pulmón y cáncer de ovario.

Objetivos específicos:

Objetivo 1: Desarrollar un modelo visual en 3D a escala de un exosoma circulante.

Objetivo 2: Estudiar el papel de los exosomas en la inducción de resistencia a quimioterapia.

- Seleccionar el modelo celular experimental adecuado para el desarrollo de este trabajo, a través del estudio funcional del efecto de los exosomas en la respuesta a cisplatino.
- Caracterizar el contenido microRNómico y proteómico de los exosomas procedentes de células resistentes a fármacos derivados del platino e identificar posibles candidatos implicados en el proceso de resistencia.
- Identificar microARNs endógenos o *“housekeeping”* para la correcta normalización de los niveles de miARNs exosomales.

Objetivo 3: Evaluar el potencial uso clínico de los candidatos identificados con el modelo experimental en muestras de plasma de pacientes con cáncer de pulmón y ovario.

- Validar el potencial uso clínico como normalizador de los miARNs endógenos identificados.
- Estudiar el papel de los miARNs y proteínas exosomales identificados como marcadores de uso clínico en pacientes con CPNM.

Materiales y Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Modelado digital

El desarrollo del modelo integrado de exosomas se realizó durante mi estancia predoctoral en el laboratorio de “Molecular Graphics” del centro de investigación The Scripps Research Institute (San Diego, California, EEUU) en colaboración con el Dr. David S. Goodsell.

La búsqueda de los componentes proteicos se realizó utilizando la base de datos ExoCarta⁸⁵ y el sistema de búsqueda PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) para el estudio bibliográfico de los trabajos realizados hasta la fecha en exosomas. Las estructuras atómicas de las moléculas se obtuvieron en la base de datos PDB¹³⁵ (del inglés, Protein Data Bank) (<http://www.rcsb.org>) y, para aquellas no disponibles se utilizó la información proporcionada por UniProt¹³⁶ (<https://www.uniprot.org>) y se montaron con el programa Python Molecular Viewer¹³⁷. Las glicosilaciones específicas de cada proteína se añadieron en las posiciones indicadas en UniProt utilizando el programa Glycoprotein Builder (<http://glycam.org>). Para la estimación de la concentración de las proteínas del contenido exosomal se utilizó la base de datos PaxDB¹³⁸ (<https://pax-db.org>), además del sistema de búsqueda PubMed. A partir de dichas estructuras, la ilustración manual se realizó usando las técnicas de acuarela previamente reportadas por el Dr. Goodsell¹³⁹. Los modelos digitales en 2D y 3D se desarrollaron con los programas CellPAINT¹⁴⁰ y CellPACK¹⁴¹, respectivamente.

2. Cultivos celulares

Para el desarrollo de este trabajo se han utilizado once líneas celulares tumorales de origen humano, nueve se obtuvieron de la ATCC (del inglés, American Type Culture Collection) (Manassas, EEUU) o de la ECACC (del inglés, European Collection of Authenticated Cell Cultures) (Sigma-Aldrich, España). Todas ellas se cultivaron en RPMI (Corning) o DMEM (Gibco) suplementado con 2 mM glutamina, antibiótico (Gentamicina 50mg/ml, CELLPURE), antifúngico (Anfotericina B 250 µg/ml, Corning) y un 10% de SBF (Suero Bovino Fetal) libre de exosomas. La eliminación de las vesículas del SBF se realizó mediante ultracentrifugación a 100 000 x g durante 16 h a 4 °C (Optima L-100 XP, rotor 45Ti, tubos 70 ml 355622, Beckman Coulter, EEUU) y se filtró con un filtro de 0,22 µm. Los subtipos resistentes a CDDP H23R, H460R y A2780R; y a carboplatino (CBDCA) H23R-CBDCA y A2780R-CBDCA, se establecieron previamente en nuestro laboratorio^{142,143} (**Figura 11A-F**). Las líneas celulares se expusieron a dosis crecientes de CDDP o CBDCA hasta alcanzar un índice de resistencia (IR) significativo respecto a las líneas parentales sensibles. El IR se calculó como la Concentración Inhibitoria 50 (IC₅₀), que es la concentración con la que se alcanza la muerte del 50% del cultivo celular, del subtipo resistente entre la CI₅₀

del sensible. Las variantes resistentes H23R, H460R y A2780R se seleccionaron después de una exposición final a 0,7; 0,5 y 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de CDDP, respectivamente. Las variantes resistentes H23R-CBDCA y A2780R-CBDCA se seleccionaron tras una exposición final a 2,5 y 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de CBDCA, respectivamente. Las líneas celulares de cáncer de ovario sensibles y resistentes a CDDP 41M y 41MR fueron donadas por el Dr. Kelland y se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de SBF libre de exosomas. Las siete líneas celulares tumorales adicionales H1299, H727, HT29, LoVo, IMIMPC2, PANC1 y MCF7, se utilizaron para validar los resultados obtenidos a partir de las líneas celulares pareadas sensibles y resistentes establecidas en nuestro laboratorio.

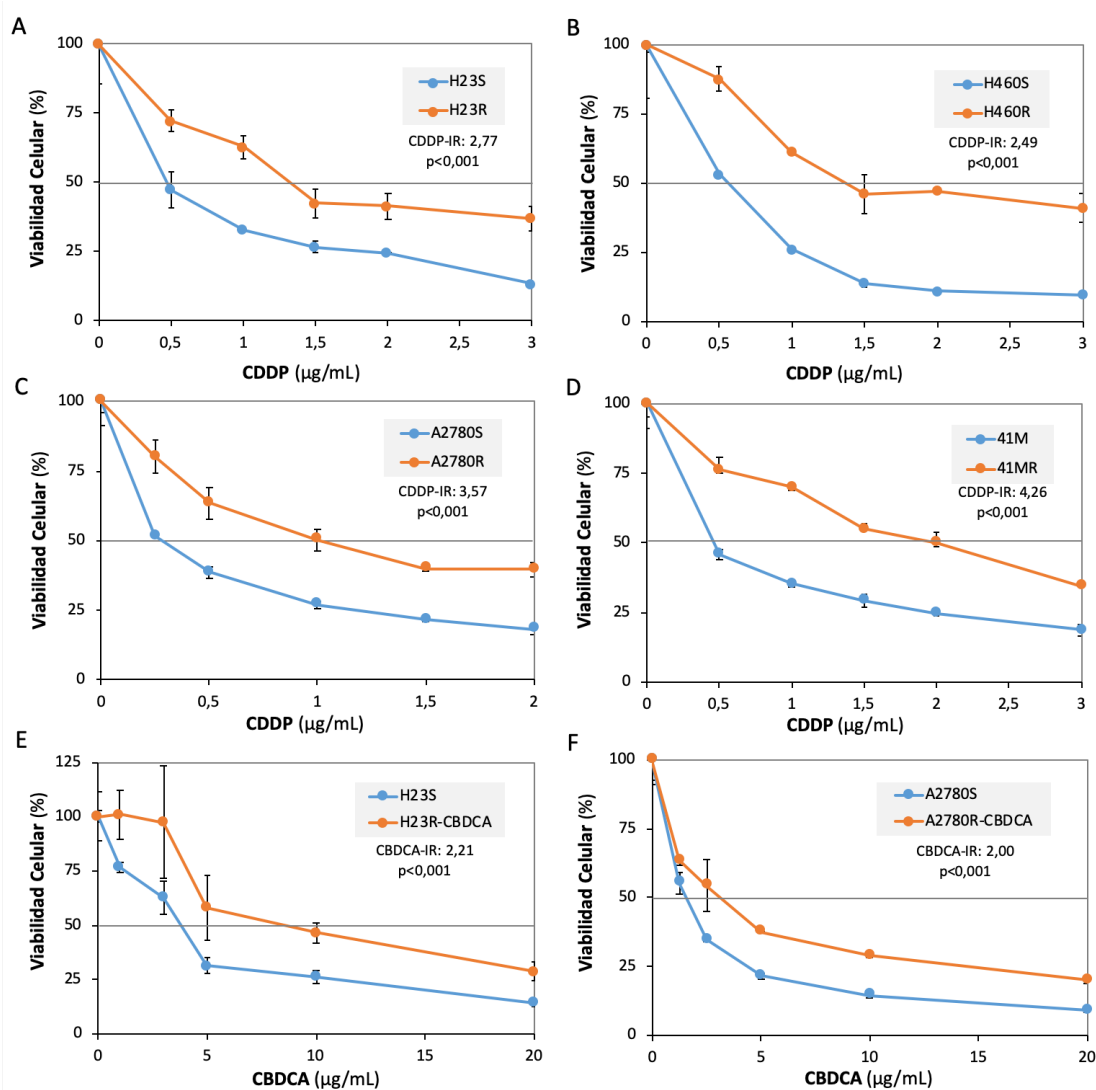


Figura 11. Curvas de viabilidad a CDDP y CBDCA. Las curvas muestran la resistencia a CDDP de las células (A) H23R, (B) H460R, (C) A2780R y (D) 41MR; y a CBDCA de las células (E) H23R-CBDCA y (F) A2780R-CBDCA. Los datos se normalizaron con respecto al control no tratado, que se estableció como el 100%. IC₅₀, es la concentración que induce la muerte del 50% de la población celular. El índice de resistencia (IR) se calcula como IC₅₀ de la línea celular resistente / IC₅₀ de la línea celular sensible. P < 0,001 se consideró como un cambio significativo en la sensibilidad al fármaco (prueba t de Student).

Todas las líneas celulares utilizadas se testaron para validar su identidad en el Servicio de Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (iiBm) CSIC-UAM, mediante el análisis de microsatélites de *loci* específicos dentro del Genoma Humano utilizando el kit GenePreintR10 (Promega, EEUU). Este sistema permite amplificar simultáneamente y marcar con diferentes fluorocromos los microsatélites D21S11, TH01, TPOX, vWA, Amelogenina, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317 y D5S818. Los perfiles obtenidos se compararon con los publicados para cada línea celular en las bases de datos disponibles, permitiendo la identificación y autenticación de líneas celulares humanas, así como la detección de contaminación intra-especies. Los resultados del análisis se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Autenticación de las líneas celulares. Servicio de Genómica del iiBm CSIC-UAM. *¹⁴⁴

Nombre Línea Celular	Tipo Tumoral	M <i>musculus</i>	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	VWA	TH01	AMEL	TPOX	CSF1PO	D21S11	REFERENCIA	Coincidencia
REF H23		Negativo	12,13	12	9,10	11	16,17	6	X	8,9	10		ATCC® CRL-5800	
H23	Pulmón	*****	12,13	12	9,10	11	16,17	6	X	8,9	10	30		Si
REF H460		Negativo	9,10	13	9,12	9	17	9.3	X,Y	8	11,12		ATCC® HTB-177	
H460	Pulmón	*****	9,10	13	9,12	9	17	9.3	X,Y	8	11,12	30		Si
REF A2780		Negativo	11,12	12,13	10	11,13	15,16	6	X	8,10	10,11	27,28	SIGMA	
A2780	Ovario	*****	11,12	12,13	10	11,12,13	15,16	6	X	8,10	10,11	28		Si
REF H1299		Negativo	11	12	10	12,13	16,17,18	6,9.3	X	8	12	32.2	ATCC® CRL-5803	
H1299	Pulmón	*****	11	12	10	12,13	16,18	6,9.3	X	8	12	32.2		Si
REF H727		Negativo	11,12	11	8,10	11,13	14,15	8	X	8	11,12		ATCC® CRL-5815	
H727	Pulmón	*****	11,12	11	8,10	11,13	14,15	8	X	8	11,12	29,32,2		Si
REF HT29		Negativo	11,12	11,12	10	11,12	17,19	6,9	X	8,9	11,12	29,30	ATCC® HTB-38	
HT29	Colon	*****	11,12	11	10	11,12	17	6,9	X	8,9	11,12	29		Si
REF LoVo		Negativo	11,12,13	8,11	9.3,10,11	9,12	17,18	9.3	X,Y	8,9	11,13,14	29,31,2	ATCC® CCL-229	
LoVo	Colon	*****	11,13	8,11	9.3,10,11	9,12	17,18	9.3	X,Y	8,9	10,13,14	29,31,2		Si
REF IMiM PC2		Negativo											Dr. F.X. Real (*)	Sin Coincidencia en ATCC o DSMZ
IMiM PC2	Páncreas	*****	12	11	8,1	11	14,16	7,9	X	11	11	29,30		
REF PANC1		Negativo	11,13	11	8,10	11	15	7,8	X	8,11	10,12		ATCC® CRL-1469	
PANC1	Páncreas	*****	11,13	11	8,10	11	15	7,8	X	8,11	10,12	28		Si
REF MCF7		Negativo	11,12	11	8,9	11,12	14,15	6	X	9,12	10	30	ATCC® HTB-22	
MCF7	Mama	*****	11,12	11	8,9	11,12	14,15	6	X	9,12	10	30		Si

3. Recogida y procesamiento de muestras de pacientes. Seguimiento y datos clínicos

Las muestras de plasma de 51 pacientes con CPNM avanzado (estadios IIIA-IV) y 10 muestras pareadas de plasma y líquido ascítico de pacientes con cáncer de ovario fueron recogidas en el Hospital Universitario La Paz antes de recibir ningún tratamiento basado en platinos y procesadas antes de los primeros 60 min desde la extracción de la muestra. Además, se recogieron 10 muestras de plasma de donantes sanos. El procesamiento de las muestras se

realizó con el protocolo estandarizado de extracción de plasma que se detalla a continuación. La sangre se recogió en tubos Vacutainer™ (BD, México) que contienen el anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético o EDTA. Los tubos se centrifugaron durante 10 min a 5130 rpm a 4 °C, se recogió el plasma y se centrifugó de nuevo a 14.000 rpm para eliminar los restos celulares. El procesamiento del líquido ascítico se realizó siguiendo las mismas centrifugaciones. Todas las muestras se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su uso. La recogida de muestras y el seguimiento de los pacientes se realizó de acuerdo con los criterios del servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario de La Paz bajo el amparo del proyecto prospectivo, observacional y no intervencionista PI15/000186, financiado por el ISCIII. Todas las muestras se recogieron siguiendo los procedimientos operativos estándar de aprobación de los Comités de Ética de Investigación Humana (código PI-2109), incluyendo el consentimiento informado en el contexto de la investigación. Los datos clínicos, patológicos y terapéuticos fueron registrados por un observador independiente y anonimizados para el análisis estadístico.

4. Aislamiento y purificación de los exosomas y de los miARNs exosomales

El aislamiento de los exosomas se realizó por diferentes metodologías, dependiendo del origen de la muestra y del tipo de análisis posterior que se fuera a llevar a cabo con ella (Tabla 5).

Tabla 5. Métodos de aislamiento de exosomas según su origen y finalidad de estudio.

Origen de la muestra	Método de aislamiento		Análisis
Sobrenadante Cultivos Celulares	Ultracentrifugación		Microscopía electrónica
			Nanosight
			Citometría de flujo
	+ Kit miRCURY RNA Isolation		Ensayos funcionales viabilidad
			Secuenciación Masiva
			qRT-PCR
Plasma Sanguíneo	Kit miRCURY Exosome Isolation	Proteómica <i>Shotgun</i>	
	Kit ExoRNeasy		qRT-PCR
	Cromatografía de exclusión molecular		Proteómica MRM

Los exosomas procedentes de líneas celulares resistentes a cisplatino H23R, H460R, A2780R y 41MR, así como los de las líneas sensibles H23S, A2780S y 41M, se aislaron a partir de 0,5-1 L de sobrenadante recogido tras 48-72 h en medio de cultivo suplementado con SBF libre de exosomas. Para eliminar células muertas y otros restos celulares, se centrifugó a 3500 rpm durante 30 min. Posteriormente, el volumen de sobrenadante de cada línea se concentró con los tubos Ultra-15 Centrifugal Filter Concentrator (Merck, Alemania) hasta obtener un volumen máximo de 70 ml por línea celular de sobrenadante concentrado y así optimizar el aislamiento de los exosomas en un solo tubo. El sobrenadante se filtró con un filtro de 0,22 µm para eliminar las vesículas de mayor tamaño y se ultracentrifugó a 100.000 x g durante 2 h a 4 °C. El precipitado se lavó con 35 ml de PBS 1X filtrado con un filtro de 0,22 µm y se volvió a ultracentrifugar a 100.000 x g durante 2 h a 4°C. El pellet de exosomas resultante se resuspendió finalmente en 300 µl de PBS 1X filtrado y se almacenó a -80 °C (**Figura 12**).

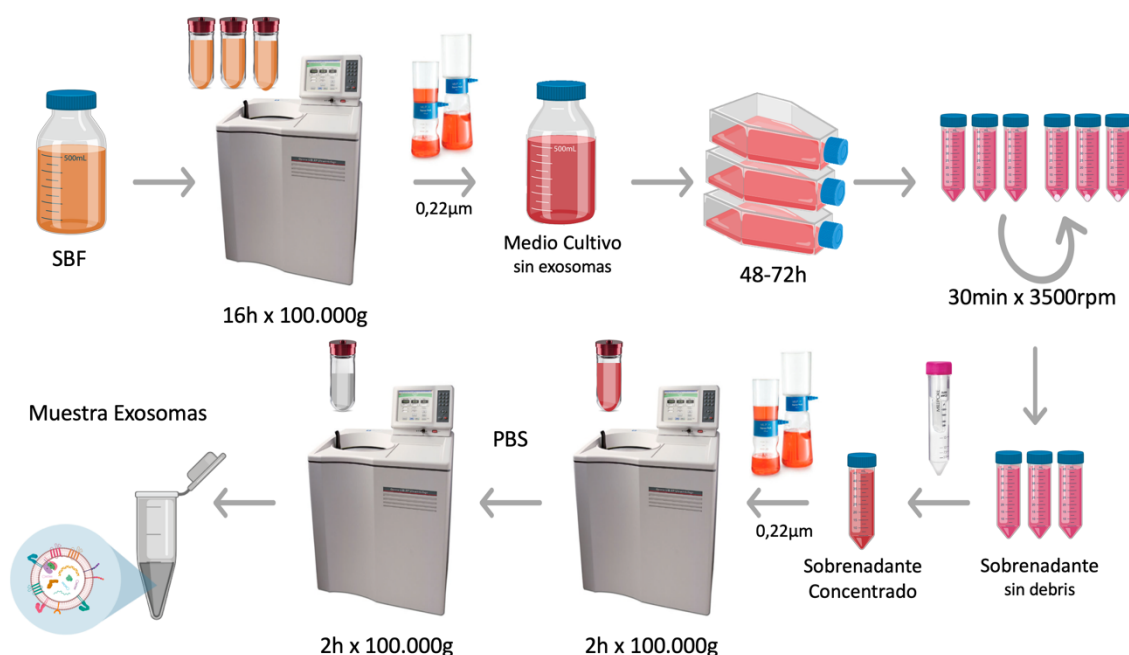


Figura 12. Protocolo extracción de exosomas de cultivos celulares.

El correcto aislamiento de exosomas derivados de las líneas celulares pareadas H23S/R, A2780S/R y 41M/MR a través del procedimiento de ultracentrifugación, se validó por microscopía electrónica y análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) con Nanosight. Los exosomas extraídos por este procedimiento se utilizaron para los ensayos con citometría de flujo y los ensayos funcionales de viabilidad.

Los exosomas derivados de las líneas celulares pareadas H23S/R, A2780S/R y 41M/MR, de los subtipos resistentes a carboplatino H23R-CBDCA y A2780R-CBDCA, así como los exosomas del resto de líneas celulares de distintos tipos tumorales se aislaron a partir de 3ml de sobrenadante con el kit miRCURY Exosome Isolation Kit (Exiqon, Dinamarca) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para los análisis de secuenciación masiva (NGS) del miRNoma y qRT-PCR, se extrajo el contenido en miARNs utilizando miRCURY RNA Isolation Kit (Exiqon, Dinamarca), siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial. Los exosomas utilizados en el estudio de proteómica *shotgun* se lisaron con tampón RIPA Pierce (ThermoFisher Scientific, EEUU) suplementado con inhibidor de proteasas Pierce (ThermoFisher Scientific, EEUU).

4.2 Aislamiento de exosomas de plasma sanguíneo

Los exosomas circulantes procedentes del plasma sanguíneo de pacientes oncológicos y donantes sanos y su contenido en miARNs se obtuvieron a partir de 1 ml de plasma filtrado con un filtro de 0,22 μm , con el kit ExoRNeasy Serum/Plasma Midi Kit (Qiagen, Alemania) según las indicaciones del fabricante.

Por otro lado, los exosomas circulantes de plasma sanguíneo de pacientes que posteriormente se utilizaron para el análisis proteómico de su contenido, se aislaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño con qEV Original Size Exclusion Column (iZON Science, Reino Unido), partiendo igualmente de 1 ml de plasma sanguíneo filtrado y siguiendo el protocolo de la casa comercial. El volumen final de fracción exosomal que se obtuvo, 1,5 ml, se redujo hasta obtener 50-100 μl utilizando el concentrador por vacío Concentrator Plus (Eppendorf) a temperatura ambiente. La cromatografía de exclusión molecular utiliza una columna que contiene una resina porosa con un tamaño específico (fase estacionaria). Las partículas que tengan un tamaño mayor al rango de aislamiento no cabrán en los poros y fluirán alrededor de dicha resina, eluyendo en las fracciones iniciales (0-6). Las vesículas eluyen principalmente entre las fracciones 7 y 9, mientras que las moléculas más pequeñas (proteínas) quedarán retenidas más tiempo en los poros y eluyen en fracciones más tardías (11-30) (**Figura 13**).

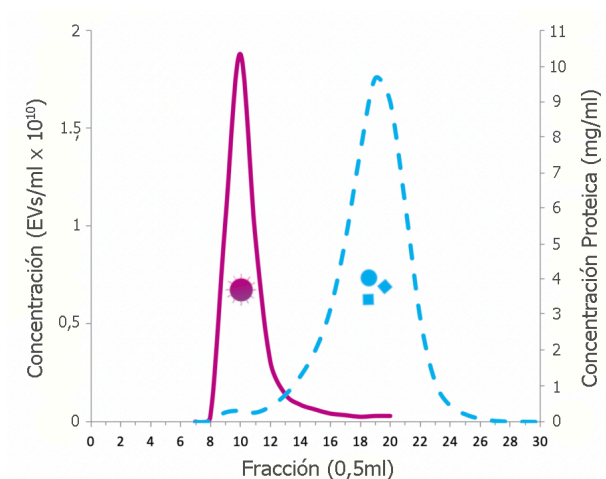


Figura 13. Perfil de elución típico de una columna qEV. La línea rosa hace referencia a los exosomas y la línea azul a las proteínas plasmáticas.

5. Identificación y caracterización de los exosomas

La identificación y caracterización externa de los exosomas de las células resistentes se realizó a partir de muestras extraídas por ultracentrifugación como se detalla en el apartado 4.1, utilizando dos metodologías:

5.1 Microscopía electrónica de transmisión

El análisis del tamaño y morfología de los exosomas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) fue realizado en el Servicio de Microscopía electrónica de transmisión de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Los exosomas se fijaron en 100 μ l de paraformaldehído (PFA) 0,1 M de tampón de fosfato al 2% (pH 7,4). Se montaron en rejillas de carbón recubiertas con una película plástica del polímero formvar. Después se realizó una post-fijación en glutaraldehído al 1%. Tras los lavados, las rejillas se contrastaron con oxalato de uranilo al 2% y se embebieron en una mezcla de acetato de uranilo al 0,4% y metilcelulosa al 1,8%. Las muestras se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1010 (JEOL, EEUU), empleando un voltaje de trabajo de 100 kV y 120.000 aumentos. El análisis de las muestras se llevó a cabo utilizando el programa DigitalMicrograph, para la visualización y procesamiento de las imágenes.

5.2 Nanosight

El tamaño y concentración de las muestras de exosomas aislados se analizó utilizando el sistema de Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA, del inglés Nanoparticle Tracking Analysis)

con el microscopio NanoSight LM10 (Malvern, Reino Unido) ubicado en las instalaciones comunes del IdiPAZ. Los exosomas se diluyeron entre 1:400 y 1:100 en PBS 1X filtrado, dependiendo de la concentración de la muestra, para mantener el rango óptimo de medida recomendado por el fabricante. El análisis de cada muestra se realizó por duplicado, a partir de 3 vídeos de 30 s, utilizando el programa específico NTA 3.0. La tecnología NTA analiza el movimiento browniano de las partículas en suspensión. Para ello, un rayo láser pasa a través de la muestra, haciendo que las partículas en suspensión dispersen la luz (**Figura 14**). A través de un microscopio de 20 aumentos con una cámara integrada se capta el movimiento browniano de las partículas, cuya velocidad está relacionada con la viscosidad y temperatura del líquido en el que están suspendidas y con el tamaño de las partículas. El programa rastrea las partículas individualmente y, por medio de la ecuación de Stokes-Einstein, calcula el diámetro hidrodinámico de cada una de ellas, así como la concentración de la muestra en partículas/ml.

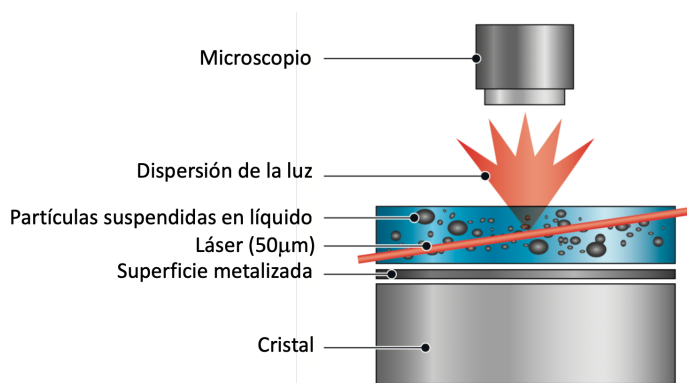


Figura 14. Sistema de Análisis de rastreo de nanopartículas con Nanosight.

6. Ensayos de internalización con citometría de flujo

Los ensayos de internalización de exosomas se realizaron mediante citometría de flujo en colaboración con el laboratorio de Fisiopatología Linfocitaria en Inmunodeficiencias del IdiPAZ, liderado por el Dr. Eduardo López Granados.

Los exosomas de las células resistentes H23R, H460R, A2780R y 41MR utilizados para los ensayos de citometría se extrajeron por ultracentrifugación como se detalla en el apartado 4.1. Para la tinción de la bicapa lipídica de los exosomas se marcaron con el fluorocromo PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit (Merk, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se prepararon 500 µl de Diluyente C mezclado con 1 µl de PKH26 para las muestras H23R y H460R; y con 2 µl de PKH26 para las muestras A2780R y 41MR. Un volumen de 250µl/muestra de solución de tinción se incubó durante 4 min con los exosomas de cada línea. La reacción de marcaje se detuvo agregando un volumen igual de PBS 1X con BSA al 3% filtrado

con un filtro de 0,22µm. Los exosomas marcados se lavaron en 35 ml de PBS 1X con BSA al 3% y se ultracentrifugaron a 100.000 x g durante 2 h a 4 °C. En el caso de los exosomas de las líneas de pulmón H23R y H460R se realizó un segundo lavado. Una vez obtenido el precipitado de exosomas, se resuspendieron en PBS 1X filtrado. Exactamente el mismo proceso se realizó con PBS como control para determinar la fluorescencia basal del PKH26.

Para los ensayos de internalización, se marcaron las células sensibles con el fluorocromo CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit (Thermofisher Scientific, EEUU). Brevemente, 10⁶ células se resuspendieron en PBS suplementado con 5% de SBF libre de exosomas y se incubaron durante 20 min con 20 µl de CTV 1 µM. Un volumen de 200 µl, correspondiente a 200.000 células teñidas se sembró conjuntamente con 100 µl de exosomas o PBS control marcados con PKH26 en una placa multipocillo p96. Después de 20 h de co-incubación, las células se tripsinizaron, lavaron y pasaron a través del citómetro de flujo Facs Canto II (BD Biosciences, EEUU). Para medir la tasa de mortalidad asociada a la incubación con exosomas, se utilizó el marcaje 7-aminoactinomicina D (7AAD) (BD Biosciences, EEUU). El análisis de los resultados se realizó con el programa FLOWJO (FLOWJO LLC, EEUU).

7. Ensayos de incubación con exosomas y viabilidad a cisplatino

Se sembraron las células 41M y 41MR en placas multipocillo p96 en una concentración de 20.000 células/pocillo. Los exosomas de las células resistentes 41MR fueron aislados por ultracentrifugación como se describe en el apartado 4.1 de la metodología y se cuantificaron mediante el ensayo colorimétrico Bradford (Bio-rad, CA, EE. UU.). Una concentración de 80 µg/ml de exosomas^{128,145} se incubó con las células sensibles 41MR de durante 24, 48 y 72 h. Tras el tiempo de incubación en cada caso, las células se trataron con dosis crecientes de cisplatino (Farma-Ferrer, España): 0; 0,5; 1; 1,5; 2 y 3 µg/ml. La viabilidad celular se analizó 72 h después del tratamiento farmacológico utilizando el ensayo colorimétrico CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega, España). Los ensayos con las líneas H23S/R, H460S/R y A2780S/R se realizaron siguiendo el mismo procedimiento, pero con un único tiempo de incubación con los exosomas de 48 h y dos concentraciones diferentes de exosomas: 80 µg/ml y 800 µg/célula. En todos los casos se compararon los datos con el control tratado con PBS.

Para los ensayos de viabilidad con los exosomas procedentes de las líneas celulares sensibles H23S, A2780S y 41M, se realizó el mismo procedimiento de aislamiento de las

vesículas. A continuación, se sembraron, por triplicado, 40.000 células/pocillo de cada línea celular resistente H23R, A2780R y 41MR, en placas multipocillo p24 y se incubaron con los exosomas sensibles o con PBS durante 48 h a una concentración de 80 µg/ml de exosomas/célula o un volumen equivalente de PBS. Tras el tiempo de incubación, se trataron las células con una única dosis de cisplatino, correspondiente a la IC₅₀ de cada línea celular: 0,5 µg/ml para H23R, 0,25 µg/ml para A2780R y 1,5 µg/ml para las 41MR. Tras 72 h de exposición al fármaco, las células se fijaron con 1 ml/pocillo de glutaraldehído (Merck, Alemania) al 1% y se tiñeron con 500 µl/pocillo de cristal violeta al 0,1% (Merck, Alemania). A continuación, las células se destiñeron con 500 µl/pocillo de ácido acético al 10% y se transfirieron 200 µl de cada pocillo a una placa de 96 pocillos para la cuantificación de su absorbancia con el lector de placas Infinite 200 PRO multimode reader (TECAN, Suiza).

8. Secuenciación masiva de miARNs exosomales e identificación bioinformática de candidatos

La extracción de los miARNs exosomales de las líneas H23S y R, A2780S y R, 41M y MR para su análisis por secuenciación masiva se realizó con los kits miRCURY Exosome Isolation Kit y miRCURY RNA Isolation Kit (Exiqon, Dinamarca), como se detalla en el apartado 4.1 de la metodología. Dicho ARN se cuantificó con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (ThermoFisher Scientific, USA) y se envió para su análisis a la compañía ArrayStar (ArrayStar Inc., EEUU). Brevemente, la preparación de las bibliotecas para la secuenciación masiva incluyó los siguientes pasos: (1) ligación con el adaptador 3', (2) ligación con el adaptador 5', (3) síntesis del ADNc, (4) amplificación por PCR y (5) selección de los fragmentos amplificados de un tamaño entre 130 y 150 pb (correspondientes a 15-35 nucleótidos (nt) de miARNs). Posteriormente se desnaturalizó el ADN para obtener hebras de cadena sencilla, que se capturaron en células de flujo de Illumina, se amplificaron in situ en agrupaciones o clusters y, finalmente, se secuenciaron con 51 ciclos utilizando el secuenciador Illumina HiSeq 2000 (Illumina Inc., EEUU).

Las lecturas obtenidas se filtraron para eliminar los adaptadores y las secuencias menores de 15nt. Las lecturas finales fueron alineadas frente a miRBase 21 utilizando el programa Novoalign (NovoCraft, Malasia). Para seleccionar los miARNs candidatos diferencialmente representados entre los fenotipos sensible y resistente, se descartaron las lecturas con recuentos menores de 2. A continuación se normalizaron como transcritos por millón de lecturas alineadas (TPM) y, para evitar falsos negativos, se seleccionaron, para cada línea, los miARNs comunes a los dos fenotipos, es decir, los que mostraban lecturas tanto en el subtipo sensible,

como en el subtipo resistente. Para las comparaciones entre fenotipos se calculó el logaritmo en base dos de la proporción o Fold Change (\log_2FC) y el p-valor entre cada grupo. A continuación, se seleccionaron aquellos pre-miARNs con un \log_2FC mayor o igual a 2, lo que equivale a unos niveles 4 veces más elevados en el fenotipo resistente frente al fenotipo sensible. Por último, se seleccionaron los miARNs que reunían dichas condiciones en al menos 2 de las 3 líneas analizadas.

Los microARNs nuevos o noveles son aquellos que no están anotados actualmente en la base de datos miRBase pero que, utilizando algoritmos de predicción, pueden ser identificados en función de los conteos obtenidos en la secuenciación masiva de los miARNs. Para ello se utilizó el programa miRDeep2¹⁴⁶ sobre las lecturas finales. Al usar un modelo simple para el procesamiento de precursores de miARNs por parte de Dicer, miRDeep es capaz de identificar la mayoría de los miARNs conocidos presentes en muestras de secuenciación masiva y obtener con ello miARNs noveles, que aún no han sido registrados en las bases de datos. Para la selección de los miARNs noveles se siguieron los mismos pasos que en el caso de los miARNs conocidos, a diferencia del último cribado, en el que se seleccionaron aquellos con un \log_2FC mayor o igual a 6 en cualquiera de las líneas, lo que equivale a unos niveles 64 veces más elevados en el fenotipo resistente frente al fenotipo sensible.

Por último, para la selección de los miARNs con potencial valor endógeno, se descartaron las lecturas con recuentos menores de 2 y se normalizaron como TPM. A continuación, se calculó el logaritmo en base dos de la proporción o Fold Change (\log_2FC) entre los fenotipos sensible y resistente para cada línea y se seleccionaron los de menor valor que tuvieran al menos un conteo por millón de lecturas en todas las condiciones experimentales. Los análisis bioinformáticos han sido desarrollados por Carlos Rodríguez, bioinformático especializado en transcriptómica y epigenómica integrante de nuestro grupo de investigación.

9. Validación de los niveles de miARNs candidatos: retrotranscripción y qRT-PCR

La extracción de los miARNs de los exosomas procedentes del secretoma de las líneas celulares y de las muestras de plasma sanguíneo de los pacientes se realizó con los kits miRCURY Exosome Isolation Kit y miRCURY RNA Isolation Kit (Exiqon, Dinamarca) en el primer caso y con el kit ExoRNeasy Serum/Plasma Midi Kit (Qiagen, Alemania), como se describe en los apartados 4.1 y 4.2 de la metodología. La extracción del ARN total de las células se realizó mediante el método de tiocinato de guanidina con Qiazol (Qiagen, Alemania) y cloroformo (Merck,

Alemania). El pellet resultante de la precipitación con isopropanol se resuspendió en agua libre de RNAsas (Gibco) y se congeló a -80 °C hasta su uso. La concentración de ARN de todas las muestras se cuantificó con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermofisher Scientific, USA).

La retrotranscripción inespecífica de todos los miARNs de cada muestra se llevó a cabo utilizando el kit TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermofisher Scientific, EEUU), según las instrucciones del fabricante. A continuación, el análisis cuantitativo de cada miARN específico se realizó utilizando sondas TaqMan™ Advanced miRNA assays y la mezcla de reacción TaqMan™ Universal PCR Master Mix o TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermofisher Scientific), dependiendo del ensayo (**Tabla 6**). Las muestras se analizaron por triplicado con el termociclador HT7900 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EEUU). Los parámetros utilizados fueron: 10 min a 95 °C y 40 ciclos de 15 s a 95 °C seguido de 1 min a 60 °C en el caso de la mezcla de reacción TaqMan™ Universal PCR Master Mix, y 20 s a 95 °C seguido de 40 ciclos de 1 s a 95 °C y 20 s a 60 °C en el caso de la mezcla de reacción TaqMan™ Fast Advanced Master Mix. La cuantificación relativa de la expresión se realizó con el programa RQ Manager (Thermofisher Scientific, EEUU), que se basa en el método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ¹⁴⁷. El valor de ΔCt se calculó restando el valor Ct del control endógeno miR-151a al valor Ct del miARN seleccionado.

Tabla 6. Lista de miARNs utilizados para qRT-PCR. Se indica el número de acceso, nombre del ensayo TaqMan™, tipo de MasterMix y secuencia del miARN maduro.

Nombre miARN	Número de acceso	Número de ensayo Sonda TaqMan™	Tipo de MasterMix	Secuencia Madura
miARNs conocidos				
hsa-miR-16-5p	MI0000070	477860_mir	Universal PCR	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
hsa-miR-22-5p	MI0000078	477987_mir	Universal PCR	AGUUCUUCAGUGGCAAGCUUUA
hsa-miR-27a-3p	MI0000085	478384_mir	Universal PCR	UUCACAGUGGCUAAGUCCGC
hsa-miR-151a-3p	MI0000809	477919_mir	Ambas	CUAGACUGAAGCUCCUUGAGG
hsa-miR-142-3p	MI0000458	477910_mir	Universal PCR	UGUAGUGUUUCCUACUUAUGGA
hsa-miR-221-3p	MI0000298	477981_mir	Universal PCR	AGCUACAUUGUCUGUGGGUUUC
hsa-miR-363-3p	MI0000764	478060_mir	Universal PCR	AAUUGCACGGUAUCCAUCUGUA
hsa-miR-451a	MI0001729	478107_mir	Universal PCR	AAACCGUUACCAUACUGAGUU
hsa-miR-891a-5p	MI0005524	479196_mir	Fast Advanced	UGCAACGAACCUGAGCCACUGA
hsa-miR-892a	MI0005528	479371_mir	Fast Advanced	CACUGUGUCCUUCUGCGUAG
miARNs novedades*				
hsa-miR-"36434"	-	Personalizada	Fast Advanced	AGGGUUGGGCUUGGGGA
hsa-miR-"5149"	-	Personalizada	Fast Advanced	GAGACUGGAGAACUAGAGC
hsa-miR-"55745"	-	Personalizada	Fast Advanced	AGUGAAUAGACUUGAGAGG

* Los nombres de los miARNs novedades ("") se asignaron de acuerdo con su posición cromosómica y se encuentran en espera de una nomenclatura oficial.

10. Transfección con mimics y curvas de viabilidad a CDDP

Se sembraron 10^6 células de cada línea celular en placas multipocillo p24 para los ensayos de viabilidad con platino. Al día siguiente, las células fueron transfectadas con 10 o 20 nM de los miARNs sintéticos (mimics) miR-451a (Ref: MC10286), miR-142-3p (Ref: MC10398), miR-891a-5p (Ref: MC12935) o del control negativo (Ref: 4464058) (Thermofisher Scientific, EEUU) utilizando el reactivo de transfección JetPrime (PolyPlus, Francia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El mimic correspondiente al miR-55745 fue sintetizado a partir de su secuencia (**Tabla 6**) por la casa comercial (Thermofisher Scientific, EEUU). Tras 6 h de la transfección, las células se trataron con dosis crecientes de cisplatino (Farma-Ferrer, España). Para cada línea celular, la concentración de platino se calculó dada su IC_{50} . Tras 72 h de exposición al fármaco, las células se fijaron con 1 ml/pocillo de glutaraldehído (Merck, Alemania) al 1% y se tiñeron con 500 μ l/pocillo de cristal violeta al 0,1% (Merck, Alemania). A continuación, las células se destiñeron con 500 μ l/pocillo de ácido acético al 10% y se transfirieron 200 μ L de cada pocillo a una placa de 96 pocillos para la cuantificación de su absorbancia con el lector de placas Infinite 200 PRO multimode reader (TECAN, Suiza). La efectividad de la transfección se analizó a partir de placas p35 en las que se sembraron 200.000 células y que fueron paralelamente transfectadas con las concentraciones de mimic correspondientes y que se almacenaron a -80°C para la posterior extracción de ARN y el análisis de los niveles del miARN por qRT-PCR.

11. Análisis proteómico

Los análisis del contenido proteico de los exosomas de líneas celulares y de plasma de pacientes con CPNM se realizó mediante espectrometría de masas en colaboración con el Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). La extracción de las muestras de exosomas de las líneas celulares y del plasma de los pacientes se detalla en los apartados 4.1 y 4.2 de la metodología.

La espectrometría de masas (MS) es una técnica de análisis que permite determinar la relación masa-carga (m/z) de iones formados a partir de compuestos orgánicos e inorgánicos, fragmentarlos de manera controlada y obtener información cualitativa y cuantitativa a partir de los espectros MS1 y MS2 obtenidos. La MS constituye una herramienta fundamental para el análisis de proteínas a gran escala y, dentro de las técnicas que engloba, el método más común es la proteómica *shotgun*, que permite identificar las proteínas presentes en muestras complejas a partir de la caracterización de péptidos resultantes de su digestión proteolítica mediante

cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), que combina la separación física por cromatografía líquida con el análisis por espectrometría de masas. La abundancia relativa de los péptidos identificados puede calcularse empleando diferentes aproximaciones, entre las que se encuentra el denominado spectral counting, o estimación en base al número de veces que se identifica un espectro¹⁴⁸ y las aproximaciones basadas en marcaje metabólico (SILAC), químico (iTRAQ o TMT) o libres de marcaje (label-free). Para una validación posterior de los valores de cuantificación relativos de proteínas específicas, se utilizan técnicas de proteómica dirigida, con el uso de espectrómetros de masas conocidos como triples cuadrupolos¹⁴⁹. En esta técnica, el primer cuadrupolo (Q1) actúa como un filtro en el que se seleccionan valores predefinidos de m/z correspondientes a los péptidos específicos o únicos de la proteína de interés. En el segundo cuadrupolo (Q2) se fragmentan los péptidos que han pasado el primer filtro y, en el tercer cuadrupolo (Q3), se vuelve a aplicar un filtro que permite separar los distintos fragmentos o transiciones de cada péptido para poder medir su intensidad (**Figura 15**). Los términos SRM (del inglés, Selected Reaction Monitoring) y MRM (del inglés, Multiple Reaction Monitoring), hacen referencia a dos modalidades de proteómica dirigida, según se monitoricen una o más transiciones del péptido precursor, respectivamente.

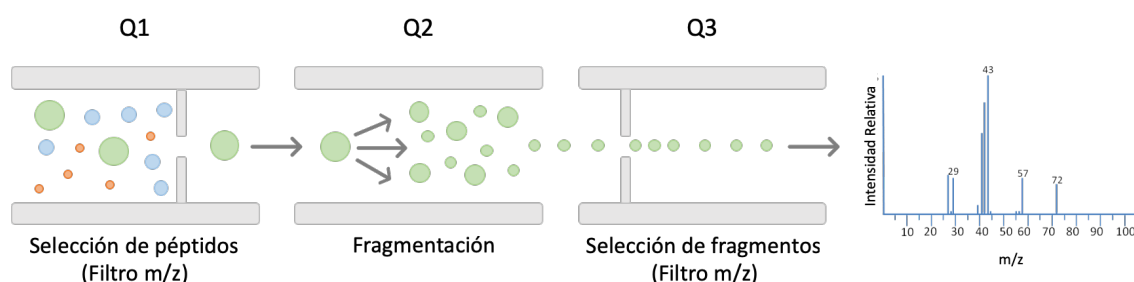


Figura 15. Representación esquemática del funcionamiento de un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. Q1 y Q3 actúan como filtros de masas para aislar los péptidos y fragmentos de péptidos de interés. m/z : masa/carga. Modificada de¹⁵⁰.

11.1 Digestión trípica

Todas las muestras se cuantificaron con Micro BCA™ Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, EEUU). Un total de 1,5 μg de cada muestra se disolvieron en Urea 8 M y bicarbonato amónico 25 mM (Merck, Alemania). Los puentes disulfuro fueron reducidos con ditiotreitól (DTT) 10 mM y las cisteínas se alquilaron con yodoacetamida (IAM) 50 mM (Merck, Alemania), como se describió previamente¹⁵¹. La concentración de urea se redujo a 2 M con bicarbonato de amonio 25 mM (volumen final 40 μl) y las muestras se digirieron durante toda la noche a 37 $^{\circ}\text{C}$ con tripsina (Merck, Alemania), en una proporción sustrato:enzima de 25:1. Tras la digestión, las muestras se desalaron utilizando ZipTip C18 (Merck).

11.2 Síntesis de péptidos

Para validar los métodos de proteómica dirigida MRM y para confirmar la secuencia peptídica mediante proteómica *shotgun* se utilizaron péptidos sintéticos. La síntesis de péptidos se llevó a cabo en un sintetizador de péptidos automatizado Multiprep (Intavis, Alemania), utilizando química standard Fmoc (Merck, Alemania).

11.3 Análisis proteómico *shotgun* mediante espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)

Los péptidos tripticos resultantes de la digestión del contenido proteico de las muestras de exosomas procedentes de las líneas celulares sensibles y resistentes a CDDP (H23S/R, A2780S/R y 41M/R) se analizaron mediante proteómica *shotgun* de la siguiente manera: el análisis nano-LC ESI-MSMS se realizó usando un nanocromatógrafo líquido Eksigent 1D-nanoHPLC acoplado a un espectrómetro de masas 5600TripleTOF QTOF (Sciex, EEUU). La columna analítica utilizada fue una columna de fase inversa C18 basada en sílice Waters nanoACQUITY UPLC 75 μm x 15 cm; 1,7 μm de tamaño de partícula. La columna de atrapamiento Acclaim PepMap 100, diámetro de partícula de 5 μm , tamaño de poro de 100 Å, se conectó en línea con la columna analítica. La bomba de carga suministró una solución de ácido fórmico: agua: acetonitrilo 0,1%: 98%: 2% (Scharlab, España) a 3 $\mu\text{l}/\text{min}$. La nanobomba proporcionó un caudal de 250 nl/min y se hizo funcionar en condiciones de elución en gradiente, utilizando ácido fórmico al 0,1% (Fluka, Suiza) en agua como fase móvil A y ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo al 100% como fase móvil B. La elución del gradiente se realizó de acuerdo con el siguiente esquema: condiciones isocráticas del 96% A: 4% B durante 5 min, un aumento lineal al 40% B en 220 min, un aumento lineal al 95% B en 2 min, condiciones isocráticas del 95% de B durante 5 min y volver a las condiciones iniciales en 15 min. El volumen de inyección fue de 5 μl . El sistema LC se acopló a través de una fuente de Nanospray al espectrómetro de masas. La adquisición automática se realizó en modo DDA (data-dependent) utilizando exclusión dinámica, lo que permitió obtener ambos espectros MS1 en el rango m/z 350-1250 seguidos por espectros tándem MSMS en condiciones CID de los 15 iones más abundantes. El tiempo de adquisición fue de 250 ms y 100 ms para los espectros de MS y MSMS, respectivamente. Los espectros MSMS obtenidos se utilizaron para lanzar búsquedas frente a una base de datos de proteínas correspondientes a *Homo sapiens*, descargada de UniprotKB, y empleando el motor de búsqueda Mascot v.2.6. Como parámetros de búsqueda se utilizaron 25 ppm y 0,05 Da como error para los iones precursores y los fragmentos, respectivamente, así como las siguientes modificaciones: carbamidometilación de cisteína, como modificación fija y oxidación de metionina y acetilación (N-terminal de proteína) como modificaciones variables. Los péptidos identificados se cargaron en el programa de análisis Scaffold para determinar, en base al número

de espectros identificados por péptido, de manera semicuantitativa las diferencias entre las diferentes muestras.

11.4 Análisis de proteómica dirigida MRM

La validación de las diferencias semicuantitativas identificadas mediante Scaffold se realizó mediante proteómica dirigida en formato MRM. Se validaron un total de 20 proteínas seleccionadas en muestras de exosomas procedentes de plasma de pacientes. Para ello, las muestras digeridas se diluyeron con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,2% en agua y se sometieron a un análisis MRM utilizando un nanocromatógrafo líquido 1D Plus nanoLC Ultra system (Eksigent, EEUU) conectado a un espectrómetro de masas de triple cuádrupolo Sciex 5500 QTRAP (Sciex, EEUU) equipado con una fuente nano-ESI y controlado por el programa Analyst v.1.5.2 (Sciex, EEUU).

Las muestras digeridas trópicamente se cargaron en una columna de carga C18 PepMap 300 μm I.D. x 5 mm (5 μm , 100 Å, Thermo Scientific, EEUU) y se separaron utilizando una columna BioSphere C18 de 75 μm i.d. Columna capilar de \times 150 mm (3 μm , 120 Å, nanoseparaciones). La elución en gradiente se realizó de acuerdo con el siguiente esquema: condiciones isocráticas de 98% A (agua que contiene 0,1% de ácido fórmico): 2% de B (100% de ACN con 0,1% de ácido fórmico) durante 2 min, un aumento lineal de 40% de B en 45 min, un aumento lineal hasta el 95% de B en 1 min, condiciones isocráticas del 95% de B durante 5 min y regreso a las condiciones iniciales en 5 min. El volumen de inyección fue de 5 μl .

El sistema de cromatografía líquida se acopló a través de una fuente de ionización Nanoespray (Sciex, EEUU) al espectrómetro de masas. Las configuraciones experimentales para el análisis de MRM se establecieron inicialmente con la ayuda del software Skyline v.3.6¹⁵². Se determinó automáticamente una lista de transiciones (generalmente 3-4 por péptido, con preferencia hacia los iones de masa más alta), así como los valores de energía de colisión para los péptidos candidatos. Los experimentos iniciales se realizaron a un tiempo de exploración de 20 ms para un rango de masa de 100-1250 m/z. Los valores de tiempo de retención cromatográficos obtenidos para la lista de péptidos se utilizaron para crear una versión programada del método MRM. El análisis de MS se realizó en el modo de ión positivo con un voltaje establecido a 2800V. La temperatura del gas de secado se ajustó a 150 °C a un caudal de 20 L/min. Las áreas de los picos y los valores de señal-ruido (S/N) para cada transición se determinaron utilizando Skyline v.3.6.

12. Análisis estadístico

Los resultados derivados de los ensayos *in vitro* para las curvas de viabilidad se representaron como la media \pm desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. Se analizaron mediante comparación de medias empleando la prueba t de Student, valorando previamente la igualdad de varianzas con la prueba de Levene. Para los ensayos funcionales de transfección con mimics y los análisis de expresión de los miARNs por qRT-PCR, se llevaron a cabo entre 2 y 3 experimentos independientes (tal como se indica en los pies de figura). Los datos se representan como la media \pm desviación estándar y las diferencias entre las curvas se compararon empleando la prueba t de Student. Los análisis de correlación entre los niveles de los miARNs normalizados con el endógeno exosomal miR-151a y el endógeno celular miR-16 se llevaron a cabo con una prueba de correlaciones no paramétricas de Spearman.

Para evaluar las diferencias entre los niveles de cada miARN en las muestras de individuos controles y pacientes se utilizó la representación de cajas y bigotes y la prueba t de Student. También se utilizó este tipo de representación para analizar las diferencias entre los grupos de muestras distribuidas en niveles altos y bajos según el percentil 25 o 75. La evaluación de las diferencias entre los grupos se realizó con el análisis de varianzas ANOVA. La evaluación individual de la asociación entre abundancia de potenciales biomarcadores y supervivencia se llevó a cabo mediante análisis de Kaplan-Meier, segregando los datos según el percentil 25, 50 o 75 y las diferencias se compararon con el estadístico *log-rank*.

Para la construcción del modelo de regresión de supervivencia basado en múltiples biomarcadores y parámetros clínicos se utilizó un modelo de riesgo proporcional de Cox. Se descartaron los pacientes para los que no se disponía de mediciones de abundancia de proteínas y, para evitar problemas de multicolinealidad, se llevó a cabo un filtro de correlación¹⁵³ con un umbral de 0,7. Para eliminar las diferencias debidas a la escala de medida de cada uno de los parámetros de estudio, se utilizó la transformación BoxCox, centrado y escalado¹⁵³, obteniéndose distribuciones simétricas, aproximadamente normales y con la misma media y varianza. Con el fin de eliminar informadores redundantes se utilizó el método lasso de regresión penalizada en norma L1^{154,155} compatible con el modelo de Cox. El valor del parámetro de penalización se optimizó de forma automatizada por 5-fold cross-validation.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando los programas SPSS v23.0 y R (versión 3.5.1) con RStudio (versión 1.1.423), utilizando también los paquetes tidyverse, ggcorrplot, ggdendro, mclust, caret, e1071, survival, survminer y glmnet.; y se consideraron valores de $p < 0,05$ como estadísticamente significativos.

Resultados

RESULTADOS

PARTE 1. MODELO VISUAL INTEGRADO DE UN EXOSOMA CIRCULANTE

1.1 Componentes

Para la creación de un modelo visual a escala de un exosoma circulante, el primer paso fue explorar los componentes exosomales y los del plasma sanguíneo que debían formar parte de este. Aunque se han realizado muchos estudios de proteómica en exosomas asociados a diversas patologías, en este trabajo decidimos modelar un exosoma genérico, que incluyera los componentes más frecuentemente contenidos en los exosomas.

Proteínas exosomales

En cuanto al contenido proteico, incluimos un listado de 30 proteínas que se han descrito en la mayoría de los estudios proteómicos realizados en exosomas (**Tabla 7**). Inicialmente, se incluyeron 20 de las primeras 25 proteínas recogidas en la base de datos ExoCarta. Además, se seleccionaron 10 proteínas adicionales mediante la recopilación manual de información de estudios proteómicos de exosomas y revisiones bibliográficas^{85,156–169}.

Para cada proteína seleccionamos la estructura más completa de la lista de entradas de la base de datos Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org>) recogidas en UniProt (<https://www.uniprot.org>) y determinamos su estado de oligomerización individualmente consultando la literatura. En algunos casos no existe la estructura completa de la proteína en PDB, por lo que utilizamos las estructuras individuales de los diferentes dominios y junto con la información disponible en la bibliografía acerca de su disposición tridimensional en la proteína, construimos la estructura completa utilizando el programa informático Python Molecular Viewer, como se describe a continuación.

La proteína TSG101 posee un dominio UEV seguido de una región de helicoide enrollado, sin embargo, el estado de oligomerización de esta proteína sigue siendo controvertido. Algunos estudios indican que una única subunidad participa en el complejo ESCRTI¹⁷⁰, mientras que otros apuntan a que se trate de un homotetrámero¹⁷¹. Por lo que, en este caso escogimos tratarlo como un monómero dentro del exosoma.

En el caso de la chaperona HSC70, que se compone de dos dominios NBD y SBD, conectamos manualmente las estructuras de ambos en función del estudio de Stricher et al.¹⁷².

La estructura de CD81 se utilizó para representar las tres tetraspaninas (CD81, CD9 y CD63) y las glicosilaciones específicas de cada una indicadas en UniProt se añadieron utilizando el programa Glycoprotein Builder (<http://glycam.org>).

La integrina se modeló a partir de la estructura disponible de los dominios extracelulares de la integrina $\alpha 5\beta 1$, mientras que la disposición de los segmentos transmembrana y los pequeños dominios citosólicos se basó en el estudio de Lau et al.¹⁷³ a partir de las estructuras de la integrina $\alpha 2\beta 3$.

Por último, el dominio transmembrana de los antígenos leucocitarios humanos (HLA) de clase I y II, se modeló basado en la longitud de las cadenas recogida en UniProt.

Ácidos Nucleicos exosomales

La longitud de los fragmentos de ADN contenido en los exosomas muestra un amplio rango, de 35pb a 17kpb, con un enriquecimiento de los tamaños comprendidos entre 6kpb y 17kpb^{106,107,109,174–176}. A partir de dicha información, decidimos incluir en el modelo un fragmento de ADN de doble cadena de 10kpb repitiendo la estructura de un oligonucleótido (entrada 6bna en PDB).

El ARNm exosomal es típicamente pequeño y heterogéneo, <200nt¹⁷⁷ y se modeló utilizando la región de cadena simple del ARNm con entrada 3iz4 en PDB.

Por último, se ha descrito que los miARNs exosomales son principalmente pre-miARNs⁹⁸, aunque algunos investigadores los han identificado formando complejo con la proteína Argonauta 2 (Ago2) dentro de los exosomas^{99,100}. Por tanto, para el modelo utilizamos la estructura del pre-miR21 (entrada 5uzt en PDB) y la estructura de Argonauta 2 unida a un ARN guía (entrada 4w5n en PDB).

Proteínas del plasma sanguíneo

La información bibliográfica disponible sobre el plasma sanguíneo es mucho más amplia, debido a que desde hace muchos años ha sido objeto de estudio. En nuestro modelo hemos incluido las 11 proteínas que tienen una concentración mayor de 7mM¹⁷⁸ en plasma (**Tabla 8**), asegurándonos de que en el volumen de sangre representado en el modelo hay, al menos, una copia de cada componente. Además, incluimos el complejo formado por Argonauta2 y un miARN, ya que existe cierta controversia sobre la presencia de miARNs libres en plasma^{101,103}. Las estructuras de los componentes del plasma sanguíneo se basaron en trabajos previos del grupo del Dr. Goodsell¹⁴⁰ y la estructura de las LDL se basó en un estudio de criomicroscopía electrónica (entrada EMD-5239 en <http://www.emdatabank.org>).

Tabla 7. Proteínas exosomales

Nombre	Descripción	Uniprot ID	PDB ID	Concentración estimada (mol/L)	Estado Oligomérico	Referencia
Proteínas citosólicas						
HSP90	Proteína de shock térmico 90	P07900 /P08238	2cg9	9,44E-05	Heterotetrámero	85
HSPA8	Proteína de shock térmico 70	P11142	1dkz, 3hsc	1,35E-05	Monómero	85
ENO1	Enolasa	P06733	2psn	1,50E-05	Homodimer	85
PKM	Piruvato Kinasa	P14618	1t5a	4,89E-06	Homotetramer	85
LDHA	Lactato deshidrogenasa	P00338	4ojn	4,01E-06	Homotetramer	85
ALDOA	Aldolasa	P04075	5ky6	7,93E-06	Homotetrámero	85
PGK1	Fosfoglicerato Kinasa	P00558	5m1r	1,23E-05	Monómero	85
FASN	Ácido graso sintasa	P49327	2cf2	7,02E-07	Monómero	85
GAPDH	Gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa	P04406	4wnc	9,07E-06	Homotetrámero	85
PPIA	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A	P62937	5noq	3,36E-05	Monómero	85, 159
PDCD6IP (ALIX)	Proteína interactiva 6 de muerte celular programada	Q8WUM4	2oev	3,36E-05	Monómero/ Homodímero	85
TSG101	Proteína 101 del gen de susceptibilidad tumoral	Q99816	30bs, 3iv1	6,71E-05	Monómero/ Homotetrámero	85
EIF2C2 (AGO2)	Argonauta 2	Q9UKV8	4w5n	1,07E-05	Monómero	99, 100
SDCBP	Sintenina	O00560	1n99	6,71E-05	Monómero/ Homodímero	85
YWHAZ/E	Proteína 14-3-3 zeta/delta	P63104	1qja	1,32E-07	Homo/ Heterodímero	85
	Proteína 14-3-3 epsilon	P62258	2br9	3,03E-05		
EEF1A1	Factor de elongación 1 A1	P68104	1dg1	1,99E-05	Homodímero	85
EEF2	Factor de elongación 2	P13639	1n0u	7,70E-07	Monómero	85
Proteínas asociadas a la membrana						
CD63	Antígeno CD63	P08962	5tcx	7,05E-06	Monómero	85
CD81	Antígeno CD81	P60033	5tcx	4,25E-05	Monómero	85
CD9	Antígeno CD9	P21926	5tcx	3,36E-05	Monómero	85
ITG	Integrina	P08648/P0 5556	4wk4, 2k9j, 1m80	2,40E-05	Heterodímero	160, 161
RAB5A/7A	Proteína Rab-5a relacionada con Ras	P20339	1n6h	5,37E-06	Monómero	163, 164, 165
	Proteína Rab-7a relacionada con Ras	P51149	1vg8	5,37E-06	Monómero	
Proteína G	Proteína fijadora de nucleótido guanina	P10824/ P62871/ P63212	1gg2	8,56E-06	Heterodímero	162, 166
HLAI	Antígeno leucocitario humano de clase I	P03989/ P61769	1hsa	(1,44E-06)	Heterodímero	162, 167
HLAII	Antígeno leucocitario humano de clase II	P01903/ P04229	1dlh	(2,88E-06)	Heterotetrámero	162, 167

Tabla 8. Proteínas del plasma sanguíneo

Nombre	Descripción	Uniprot ID	PDB ID	Molaridad (mol/L)	Estado Oligomérico
<i>Proteínas del plasma</i>					
ALB	Albúmina	P02768	1e7i	6,4E-04	Monómero
TF	Transferrina	P02787	3v83 A	4,2E-05	Monómero
IgG	Inmunoglobulina gamma	P01857,P0 DOX7/8	2ig2, 1fc2	8,7E-05	Heteroligómero
IgA	Inmunoglobulina alpha	P01876,P0 DOX7/8	2 (2ig2, 1fc2)	7,87E-06	Heteroligómero
IgM	Inmunoglobulina mu	P01871,P0 DOX7/8	2rcj	1,97E-06	Heteroligómero
FGA, FGB	Fibrinógeno	P02671, P02675	1m1j	7,2E-06	Heteroligómero
SERPINA1	α_1 -antitripsina	P01009	1psi	3,9E-05	Monómero
HP	Haptoglobina	P00738	4x0l	3,8E-06	Heterotetrámero
HPX	Hemopexina	P02790	1qjs	6,5E-05	Monómero
HDL	Lipoproteína de alta densidad	P02647	2msc A,C	2,32E-05	Heteroligómero
LDL	Lipoproteína de baja densidad	P04114	-	1,4E-06	Heteroligómero
EIF2C2 (AGO2)	Argonauta 2	Q9UKV8	4w5n	(8.7E-05)	Monómero

1.2 Concentraciones

El siguiente paso en la generación del modelo fue estimar la concentración de los componentes elegidos en el interior de los exosomas. Sin embargo, la información sobre la concentración absoluta de las moléculas contenidas en el interior celular suele ser la información más difícil de encontrar cuando se elabora un estudio integrado de este tipo, por lo que supone todo un reto todavía mayor si el sujeto de estudio son estas nanovesículas descubiertas hace escasas 4 décadas.

Aunque se han realizado numerosos estudios de proteómica en exosomas, el acceso a los resultados cuantitativos es, a menudo, arduo y contradictorio. Más aún teniendo en cuenta que la cuantificación de los exosomas en sí, continúa siendo tema de debate¹⁷⁹ y que la abundancia de las proteínas varía de unas células secretoras a otras¹⁸⁰. Como resultado, no pudimos encontrar información detallada sobre la concentración de proteínas exosomales. Por lo que decidimos basar nuestro enfoque en dos etapas: (1) comenzar con la concentración de una célula donante y (2) modificar las concentraciones individuales según los estudios publicados de enriquecimiento en exosomas.

Las plaquetas son la principal fuente de exosomas en plasma¹⁸¹, por lo que basamos nuestro modelo en un estudio proteómico cuantitativo realizado en plaquetas¹⁸², en el que se reporta el número de copias de cada proteína por célula plaquetaria. Asumiendo un volumen de 9,7fL por plaqueta, se calcularon las concentraciones molares de los componentes solubles y de los componentes unidos a la membrana, así como sus números de copia para un exosoma de 100 nm de diámetro (**Tabla 7**). Dichos valores se ajustaron al rango de concentraciones típico del citoplasma de las células eucariotas, duplicándolos, ya que en el estudio de Burkhart et al. asumen que “la cuantificación absoluta basada en la cuantificación de los espectros puede arrastrar errores de hasta el 200%”. Estas concentraciones se usaron en el modelo exosomal para factores de transcripción (EEF1A1 y EEF2), enzimas (enolasa, piruvato kinasa, lactato deshidrogenasa, GAPDH, etc.), dos proteínas adaptadoras (YWHAZ y YWHAE) y la proteína G.

El siguiente paso fue aplicar un factor de enriquecimiento para aquellas proteínas que se ha reportado que están sobre-representadas en los exosomas: 6 veces para HSC70⁸⁶ y HSP90 7 veces más que HSC70⁸⁷. Un enriquecimiento de 124 veces para las tetraspaninas CD9 y CD81; y de 7 veces para CD63⁸⁸. Las proteínas del complejo ESCRT (Alix y TSG101) y las proteínas de la familia de las GTPasas monoméricas Rab (Rab7 y Rab5) interaccionan con las tetraspaninas en el tráfico intracelular de los exosomas y se encuentran frecuentemente en concentraciones altas en los estudios de proteómica¹⁸³, por lo que aplicamos un enriquecimiento arbitrario de 20 veces para todas ellas. Además co-localizamos la sintenina y las tetraspaninas en nuestro modelo, debido a que estas últimas forman microdominios que interactúan con la sintenina¹⁸⁴. No pudimos encontrar información específica sobre HLAII, por lo que establecimos una concentración similar a la de HLAI y un factor de enriquecimiento de 8 para HLAII y de 2 para HLAI⁸⁸. La concentración de Argonauta2 se estableció igual a la de Alix, ya que ambos están implicados en el empaquetamiento de miARNs en los exosomas¹⁸⁵.

El contenido de los exosomas en ácidos nucleicos es muy heterogéneo¹⁷⁹ y las concentraciones de miARNs específicos difieren en órdenes de magnitud, desde 0,00001 a 10 moléculas por vesícula. En este modelo, la abundancia de ARNm y miARNs se estableció como el valor promedio de las proteínas solubles y se incluyó una cadena de ADN de 10kb por vesícula.

Como se hizo en trabajos anteriores del Dr. Goodsell¹⁴⁰, las concentraciones de los componentes del plasma sanguíneo se basaron en estudios proteómicos¹⁷⁸ (**Tabla 8**).

1.3 Generación del modelo

Para generar el modelo en 3D se utilizaron las concentraciones descritas en el apartado anterior. Sin embargo, en el caso de la ilustración realizada a mano, se representó una sección de 10 nm, calculándose el número de moléculas en dicho volumen y se representaron de manera distribuida en 3 capas diferentes de profundidad generando un efecto 2,5D.

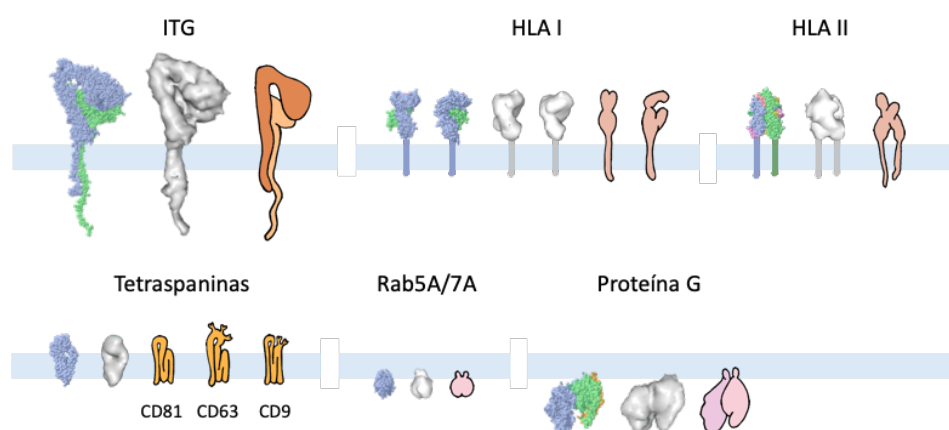
Ilustración hecha a mano

Para generar la ilustración en 2,5D hecha a mano, exploramos las estructuras atómicas de todos los componentes de los exosomas y del plasma sanguíneo, para definir en cada caso el plano que mejor reflejase la forma y función de la molécula. Dicha vista icónica fue elegida manualmente siguiendo diferentes criterios, como resaltar la simetría de un complejo, lo que permite ver cómo interactúan las subunidades de este (p. ej. HSP90) o resaltar las características funcionales de la molécula, como las hendiduras de unión en los dos dominios de HSC70. Las moléculas que interactúan con la membrana se representaron de forma paralela al plano de la página.

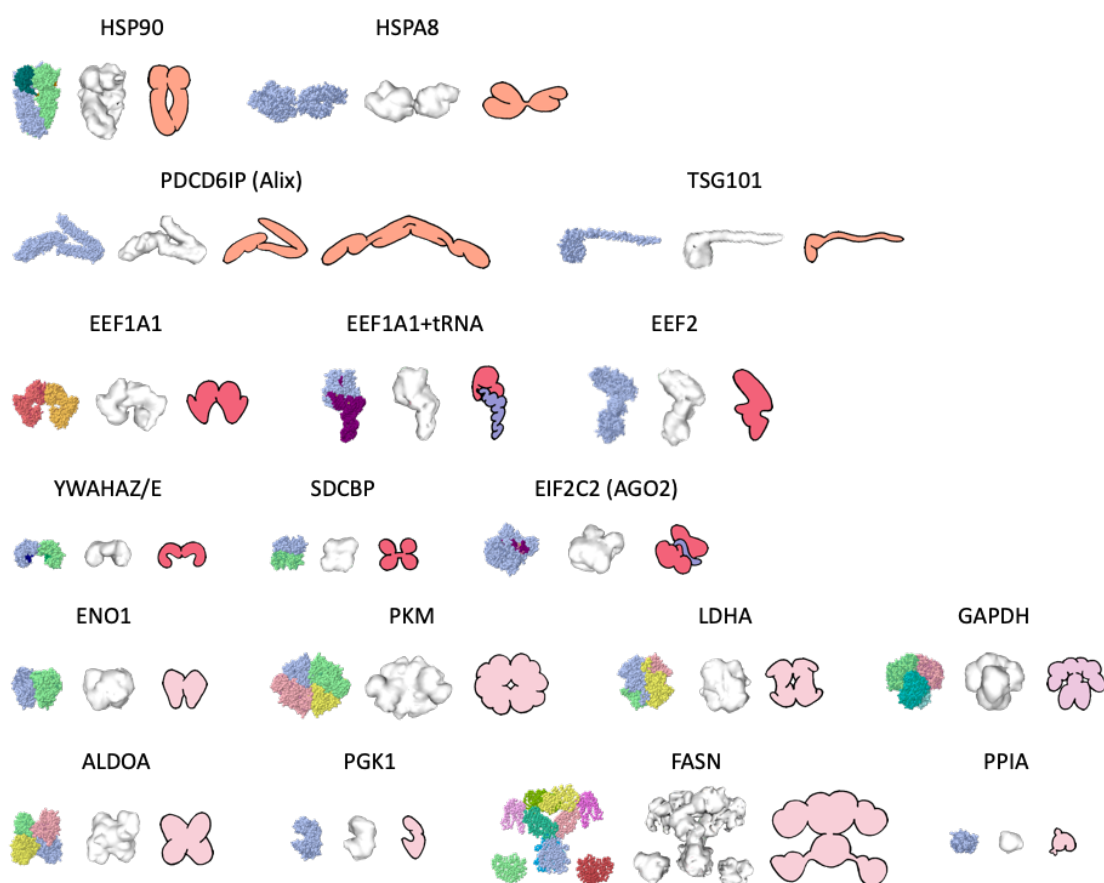
Una vez elegida la perspectiva de visualización para cada molécula, las ilustraciones dibujadas a mano se basaron en la representación de la superficie de la estructura y se realizaron en la escala adecuada (**Figuras 16 y 17**). El objetivo de la representación visual de las proteínas es simplificar la estructura para que sea más comprensible y reconocible cuando se integra en una escena compleja. Para ello, utilizamos colores planos y contornos redondeados, además en algunos casos, se agregaron líneas de gestos adicionales para relacionar las estructuras con sus funciones, por ejemplo, se agregaron líneas a las tetraspaninas para mostrar los múltiples cruces de la cadena a través de la membrana.

A continuación, creamos una ilustración hecha a mano (**Figura 18**) utilizando la técnica de acuarela descrita por el Dr. Goodsell¹³⁹. Para el diseño general del modelo, elegimos representar tres exosomas circulantes con diámetros de 50, 100 y 140 nm, colocando el exosoma de 100 nm en la posición más destacada visualmente. La ilustración incorpora licencias artísticas para mejorar la legibilidad de la escena¹⁸⁶. Por ejemplo, al utilizar una única vista para cada molécula, todos los anticuerpos en el plasma sanguíneo se representan con la icónica forma de Y. El esquema cromático se eligió con el fin de mejorar la separación entre los diferentes compartimentos, utilizando colores cálidos en los exosomas para resaltarlos dentro de la ilustración. Además, para mejorar la relación espacial del conjunto, se utilizaron tonalidades cada vez más oscuras según los diferentes planos de profundidad.

Proteínas de membrana



Proteínas luminales



Ácidos Nucleicos

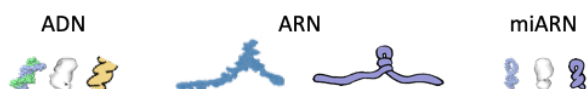


Figura 16. Desarrollo secuencial de las representaciones gráficas de los componentes moleculares del modelo de un exosoma. Para cada uno de los componentes moleculares del exosoma se muestra la estructura atómica, la representación de la superficie de la molécula y la ilustración manual. La información sobre los nombres de las proteínas, así como los archivos PDB utilizados para cada uno de los componentes se detallan en la **Tabla 7**.

Proteínas del plasma sanguíneo

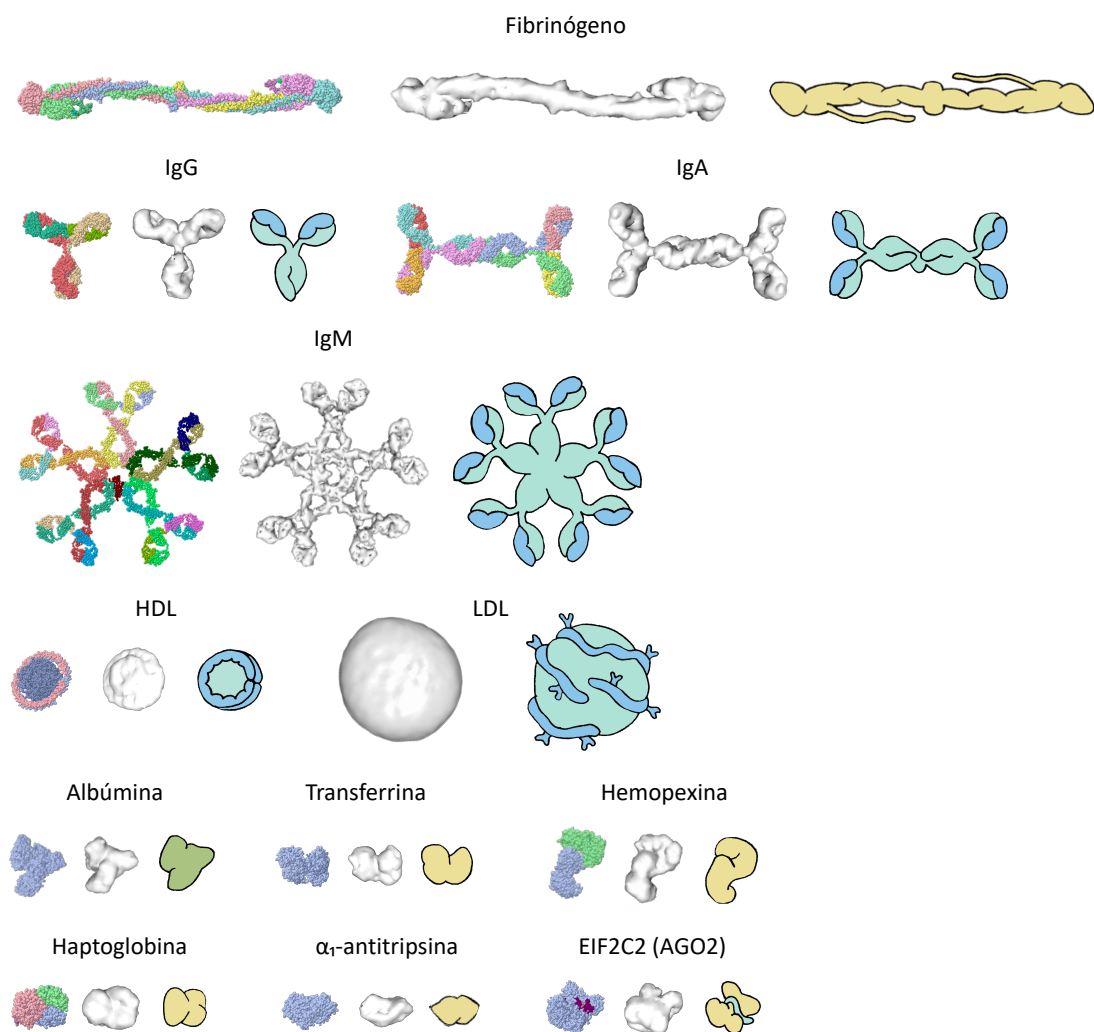


Figura 17. Desarrollo secuencial de las representaciones gráficas de los componentes moleculares del plasma sanguíneo. Para cada uno de los componentes moleculares del plasma sanguíneo se muestra la estructura atómica, la representación de la superficie de la molécula y la ilustración manual. La información sobre los nombres de las proteínas, así como los archivos PDB utilizados para cada uno de los componentes se detallan en la **Tabla 8**.

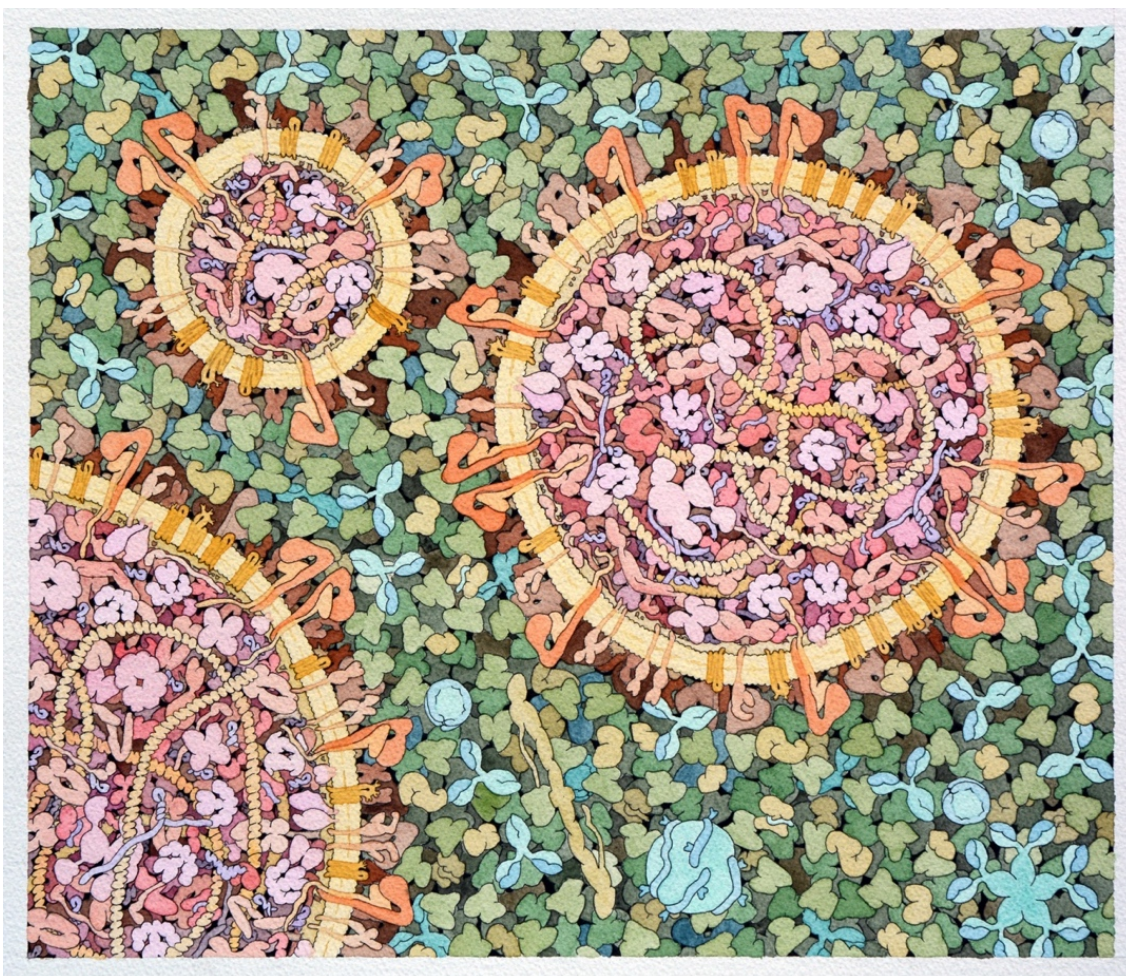


Figura 18. Ilustración en acuarela de tres exosomas circulantes de 50, 100 y 140 nm. (Julia Jiménez, 2018).

Modelo digital en 3D

Para generar el modelo en 3D se utilizaron directamente las estructuras atómicas de las moléculas y las concentraciones indicadas en la **Tabla 7**. El modelo se creó utilizando cellPACK¹⁸⁷, un programa que permite construir modelos estocásticos en 3D a partir de un listado de componentes moleculares. Este programa es capaz de definir las estructuras, ubicaciones y concentraciones de dichos componentes y distribuirlos aleatoriamente dentro de una escena compuesta por compartimentos delimitados por membranas. En nuestro modelo, se definió una membrana esférica con un diámetro de 100 nm y el listado de componentes, tanto del exosoma como del plasma sanguíneo según la información incluida en las **Tablas 7 y 8 (Figura 19)**.

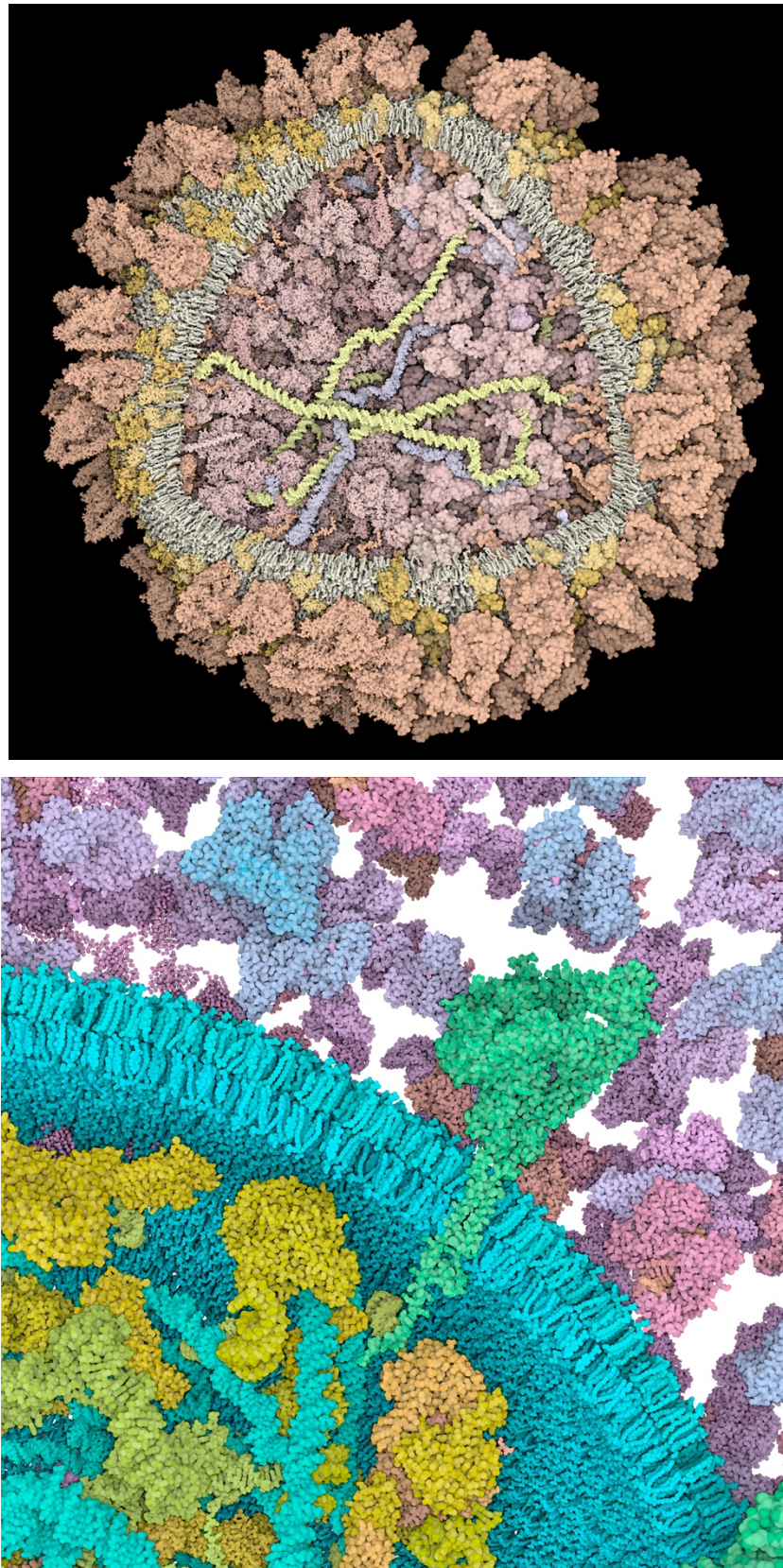


Figura 19. Modelo 3D de un exosoma. (Arriba) Exosoma aislado con una apertura en la membrana que permite visualizar las moléculas contenidas en su interior. **(Abajo)** Corte transversal del exosoma rodeado de plasma sanguíneo.

PARTE 2. PAPEL DE LOS EXOSOMAS EN LA INDUCCIÓN DE RESISTENCIA A QUIMIOTERAPIA: SELECCIÓN DEL MODELO DE ESTUDIO

Con la finalidad de estudiar el papel de los exosomas en la inducción de resistencia a cisplatino, trabajamos con un modelo experimental compuesto por líneas celulares pareadas sensibles y resistentes de cáncer de pulmón H23S/R y H460S/R; y de cáncer de ovario A2780S/R y 41M/MR, que fueron establecidas previamente en nuestro laboratorio^{142,143}.

2.1. Caracterización de los exosomas aislados del secretoma de cultivos celulares

En primer lugar, aislamos mediante ultracentrifugación los exosomas de las cuatro líneas celulares resistentes a cisplatino: H23R, H460R, A2780R y 41MR, en las que previamente se confirmó que se mantenía una resistencia al fármaco, al menos dos veces superior que en la línea celular sensible pareada, con índices de resistencia (IR) de 2,77; 2,49; 4,26 y 2,11, respectivamente ($p < 0,001$) (**Figura 11A-D**).

Para confirmar el origen exosomal de las vesículas aisladas por ultracentrifugación, caracterizamos las muestras mediante dos metodologías distintas: microscopía electrónica de transmisión y análisis de rastreo de nanopartículas NTA. Las imágenes tomadas a través de la microscopía electrónica de transmisión revelaron la presencia de estructuras esféricas con forma de copa con un tamaño aproximado entre 50 y 150 nm de diámetro (**Figura 20A**). Por otra parte, con el análisis de rastreo de nanopartículas a través del microscopio Nanosight se determinó el tamaño y la concentración de vesículas en las muestras. El perfil registrado en todos los casos mostró un tamaño medio de las partículas de alrededor de 100 nm (**Figura 20B**).

2.2 Selección del modelo experimental adecuado para la caracterización del contenido exosomal y su papel en la respuesta a platino en cáncer de pulmón y ovario

Una vez confirmado que las vesículas aisladas del secretoma de las células resistentes estaban enriquecidas en exosomas, quisimos determinar si las células del subtipo sensible eran capaces de captar dichos exosomas y modificar su respuesta al tratamiento. Para ello, marcamos las vesículas con el fluorocromo PKH26 (rojo) y las células sensibles con CTV (verde), para mejorar su detección. Ambos fueron co-incubados durante 20 h, tiempo tras el que se valoró mediante citometría de flujo la incorporación de los exosomas, en colaboración con el servicio de inmunología del Hospital La Paz. Además, para evaluar la mortalidad producida por los exosomas, se añadió 7AAD, un compuesto químico fluorescente con elevada afinidad por el ADN que es capaz de penetrar y marcar exclusivamente las células muertas.

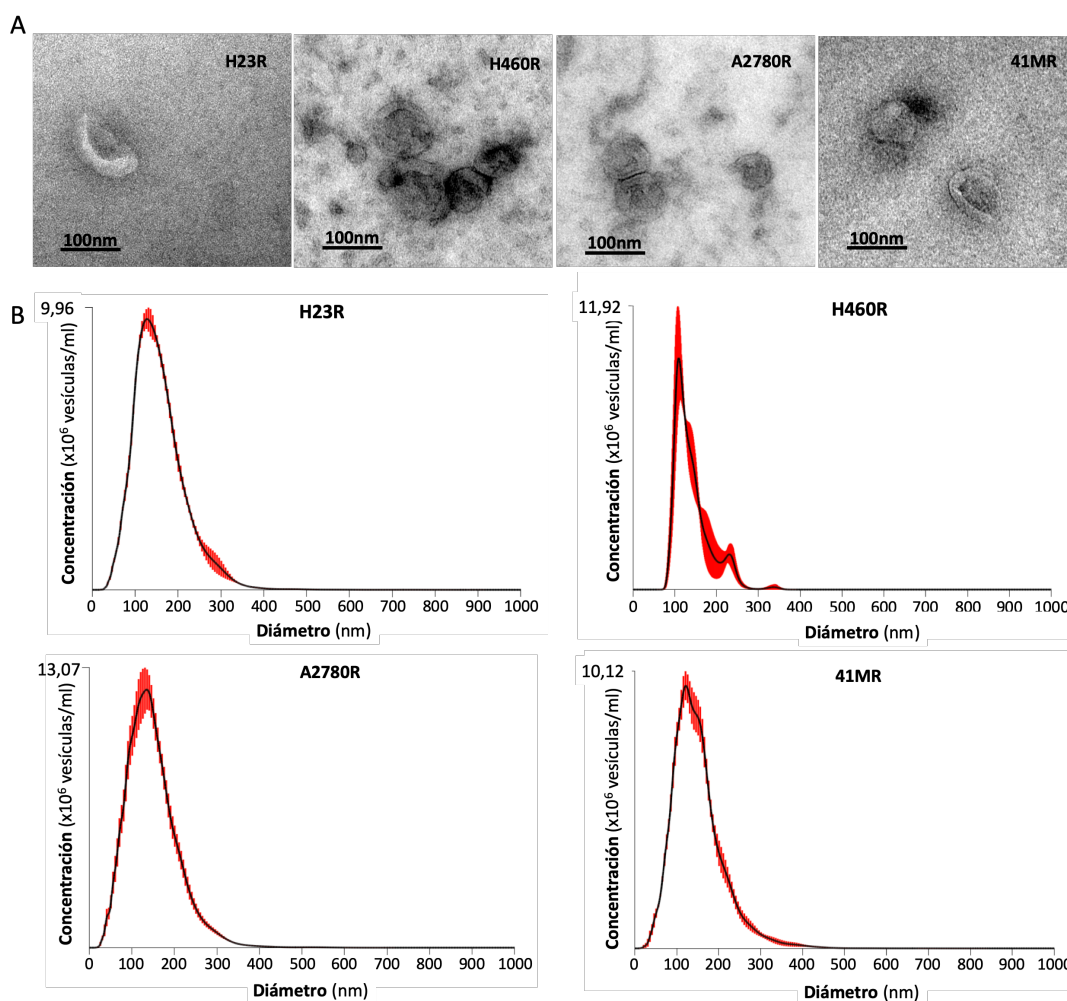


Figura 20. Caracterización de los exosomas secretados por los subtipos resistentes a cisplatino de las líneas de cáncer de pulmón H23R y H460R; y de cáncer de ovario A2780R y 41MR. (A) Visualización de los exosomas con microscopía electrónica de transmisión. Imágenes tomadas a 120.000 aumentos. **(B)** Determinación del tamaño y la concentración de los exosomas mediante Nanosight (NTA).

La internalización de los exosomas produjo una mortalidad de entre el 20 y el 40% en comparación con el control con PBS, en el que se observa una mortalidad mínima del 5% en las líneas celulares H23S, A2780S y 41M (**Figura 21A, C y D, panel izquierdo**), por el contrario, las células H460S mostraron una mortalidad basal del 40% y no hubo diferencias al incubarlas con los exosomas (**Figura 21B, panel izquierdo**). La captación de los exosomas resistentes, evaluada en la subpoblación de células vivas, tuvo lugar en el 88,1% de las células H23S, en el 50,6% de las H460S, en el 94,1% de las A2780S y en el 77,2% de las 41M, en comparación con su control con PBS, que mostró una tinción inespecífica entre 0,69 y 3,13% (**Figura 21A-D, panel derecho**).

Tras confirmar que se producía la internalización de los exosomas resistentes en más del 75% de las células H23S, A2780S y 41M, y en el 50% de las células H460S, evaluamos si dichos exosomas resistentes eran capaces de alterar la respuesta farmacológica de las células sensibles. En primer lugar, co-incubamos la línea celular sensible 41M con exosomas de las células resistentes 41MR durante 24, 48 y 72 h antes de tratarlas con dosis crecientes de cisplatino. Los resultados muestran una disminución significativa en la respuesta de las células al fármaco en función del tiempo de incubación, alcanzando la mayor resistencia con 72 h de incubación (**Figura 22A**). A continuación, utilizamos las otras tres líneas (H23S, H460S y A2780S) celulares para determinar si se producía el mismo cambio de viabilidad a CDDP incubándolas durante 72 h con sus respectivos exosomas procedentes de cada subtipo celular resistente. Observamos un aumento en la resistencia a CCP en las células H23S y A2780S tras la incubación a partir de la dosis de 1 µg/ml de CDDP (**Figura 22B y C**). Sin embargo, en las células H460S no se observó este efecto (**Figura 22D**).

Adicionalmente, evaluamos el potencial papel “sensibilizador” a CDDP de los exosomas procedentes de las células parentales. Para ello extrajimos por ultracentrifugación los exosomas de las tres líneas sensibles que mostraron un aumento de la resistencia a CDDP al ser incubadas con los exosomas resistentes (H23S, 41M y A2780S). A continuación, caracterizamos su tamaño y concentración mediante NTA, confirmando que el tamaño de las vesículas correspondía al esperado en una muestra de este tipo de nanovesículas (**Figura 23A**). A continuación, realizamos ensayos de viabilidad de dosis única, con las células resistentes co-incubadas durante 72 h con los exosomas sensibles. En este caso utilizamos la dosis de CDDP definida en cada caso por la IC₅₀ de cada línea. No se observaron diferencias significativas en la respuesta al fármaco con respecto al control en ninguna de las tres líneas celulares analizadas (**Figura 23B**).

Apoyándonos en los resultados derivados de los ensayos funcionales de internalización y de viabilidad a CDDP seleccionamos las líneas H23S/R, A2780S/R y 41M/MR como modelos celulares óptimos para los siguientes estudios de caracterización del contenido exosomal, ya que mostraron un potencial papel inductor de resistencia a platino a través de los exosomas procedentes del fenotipo resistente.

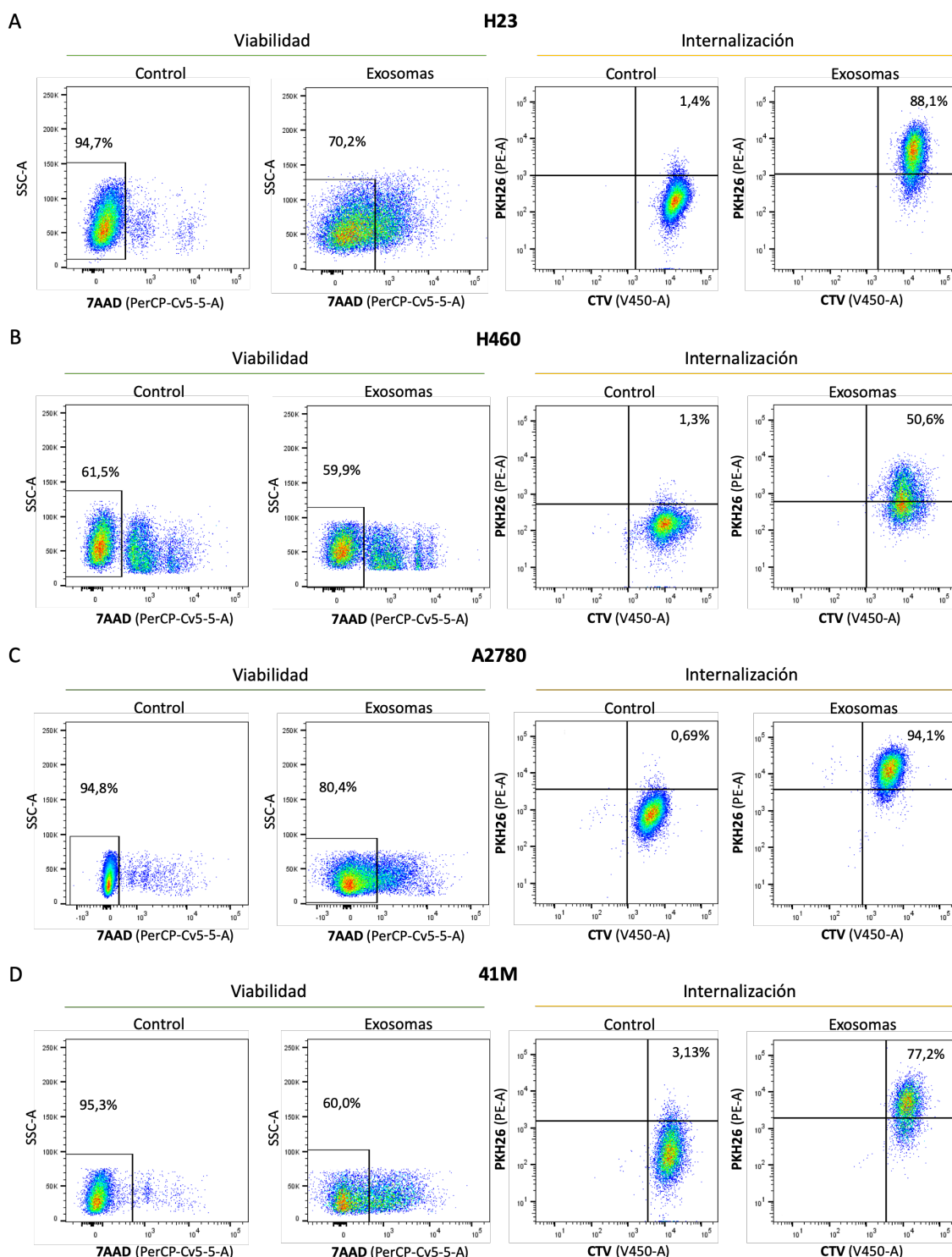


Figura 21. Análisis de viabilidad e internalización tras la incubación de exosomas procedentes del secretoma de las líneas resistentes a CDDP con líneas celulares sensibles por citometría de flujo. Los exosomas de las células resistentes fueron marcados con PKH26 y las células sensibles con CTV. **(A)** H23, **(B)** H460, **(C)** A2780 y **(D)** 41M. Los cuadrantes delimitan el carácter positivo o negativo de la señal del marcaje en cada eje. En todos los casos se utilizó PBS marcado con PKH26 como control. La viabilidad se evaluó con el compuesto 7AAD, que se une a las células muertas. Los datos de internalización se calcularon sobre el porcentaje de células vivas.

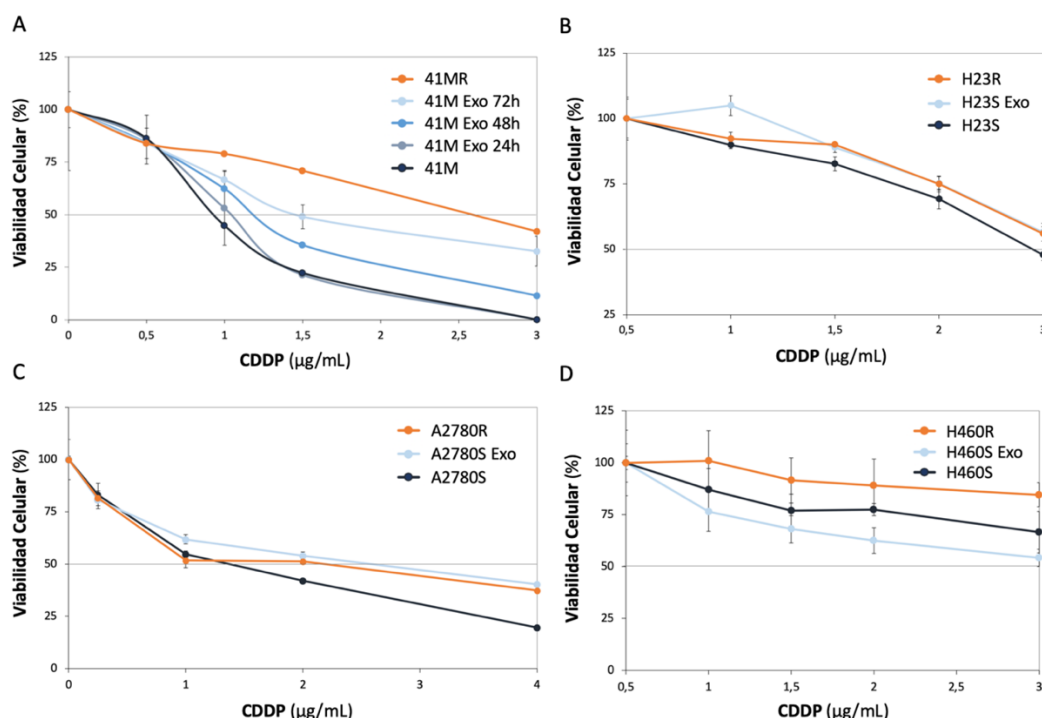


Figura 22. Ensayos funcionales de respuesta a cisplatino. Curvas de viabilidad a CDDP en las células sensibles incubadas con exosomas procedentes de cada subtipo resistente en (A) células 41M tras 24, 48 y 72 h de incubación y (B, C y D) en células H23, A2780 y H460 tras 72 h de incubación respectivamente. Los datos de cada línea celular se normalizaron con respecto al control no tratado, que se estableció como el 100%. También se muestran las curvas de viabilidad de los subtipos resistentes (naranja).

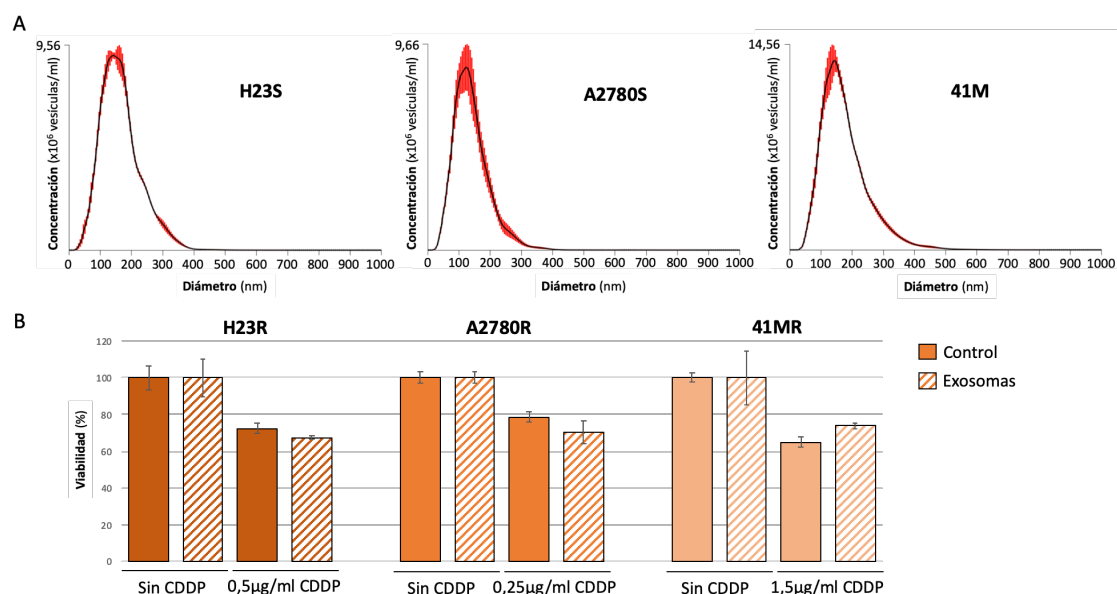


Figura 23. Caracterización de los exosomas secretados por los subtipos sensibles a cisplatino y ensayos de viabilidad a cisplatino. (A) Determinación del tamaño y la concentración de los exosomas sensibles mediante Nanosight. (B) Ensayo de viabilidad a CDDP en células resistentes H23R, A2780R y 41MR sin incubación (color liso) e incubadas con los exosomas del subtipo sensible (rayadas) a 72 h de exposición a la dosis IC₅₀ de cada línea celular.

PARTE 3. CARACTERIZACIÓN ÓMICA DEL CONTENIDO EXOSOMAL: SELECCIÓN Y VALIDACIÓN DE CANDIDATOS

Para investigar los mecanismos moleculares implicados en la adquisición de resistencia a CDDP en el compartimento exosomal, llevamos a cabo la caracterización de su contenido en miARNs y proteínas de las líneas celulares H23S/R, A2780S/R y 41M/R. Estas moléculas poseen la capacidad de generar directamente cambios postraduccionales en las células receptoras, por lo que tienen gran potencial regulador en este tipo de procesos que involucran la comunicación celular.

3.1 Análisis del microRNoma exosomal e identificación de miARNs candidatos como biomarcadores de resistencia a CDDP

Para identificar miARNs exosomales potencialmente implicados en la inducción de resistencia a cisplatino analizamos el contenido de los exosomas procedentes del secretoma de las células pareadas sensibles y resistentes H23S/R, A2780S/R y 41M/R mediante secuenciación masiva del microRNoma (small RNAseq) y comparamos los perfiles de los dos fenotipos con el fin de identificar candidatos sobre-representados en los exosomas procedente de las células resistentes.

El procesamiento bioinformático de los datos obtenidos del desarrollo del small RNA-seq se inició con una normalización de los datos a la unidad de referencia de secuenciación masiva "tránscriitos por millón de lecturas" (TPM). Tras dicha normalización se identificaron 603 y 506 miARNs en H23S y H23R, 754 y 750 en A2780S y A2780R y, por último, 725 y 790 en 41M y 41MR presentes en el contenido exosomal. En primer lugar, filtramos los datos seleccionando los miARNs comunes a ambos subtipos para cada pareja de líneas celulares, con el fin de descartar aquellos miARNs en los que podría haber errores en la captura. Se seleccionaron 355 miARNs en H23, 460 en A2780 y 499 en 41M. A continuación, seleccionamos los miARNs sobre-representados en los exosomas resistentes en comparación con los correspondientes sensibles con una diferencia de más de 4 veces (Log_2 Fold Change > 2), obteniendo 16 en H23, dos en A2780 y 30 en 41M (**Anexo 1A**). Para aumentar la solidez de nuestra selección y encontrar candidatos robustos para su posterior uso clínico, seleccionamos los siguientes cinco miARNs compartidos al menos en dos de las tres líneas celulares: miR-892a, miR-891a-5p, miR-451a, miR-363-3p y miR-142-3p (**Figura 24, izquierda**).

Paralelamente, otro análisis bioinformático diferente nos permitió identificar miARNs no descritos previamente en ninguna base de datos, a los que en este trabajo denominaremos “miARNs noveles”. Para la selección de estos miARNs seguimos el mismo procedimiento de filtrado que con los miARNs conocidos. Tras la normalización de los datos en TPM, se identificaron 356 y 254 miARNs en H23S y H23R; 335 y 461 en A2780S y A2780R; y 325 y 383 en 41M y 41MR, respectivamente. Los miARNs compartidos por los dos fenotipos de cada pareja de líneas celulares fueron un total de 223 miARNs en H23, 335 en A2780 y 264 en 41M. A continuación, del mismo modo que con los miARN conocidos, seleccionamos los miARNs que estuvieran sobre-representados más de 4 veces (Log_2 Fold Change > 2) en los exosomas resistentes frente a los sensibles, obteniendo 22 miARNs en H23 y 4 en 41M. En las A2780 ningún miARN cumplió los criterios de este cribado (**Anexo 1B**). A continuación, aumentamos la solidez de nuestros candidatos noveles eligiendo aquellos con niveles 64 veces más elevados en los exosomas del fenotipo resistente que en el del fenotipo sensible (Log_2 Fold Change > 6) en al menos una de las líneas celulares. Esta aproximación permitió identificar los siguientes tres miARNs: miR-36434, miR-5149 y miR-55745 (los nombres se asignaron de acuerdo con su posición cromosómica) (**Figura 24, derecha**). La secuencia madura de cada uno de los tres miARNs noveles se muestra en la **Tabla 6**.

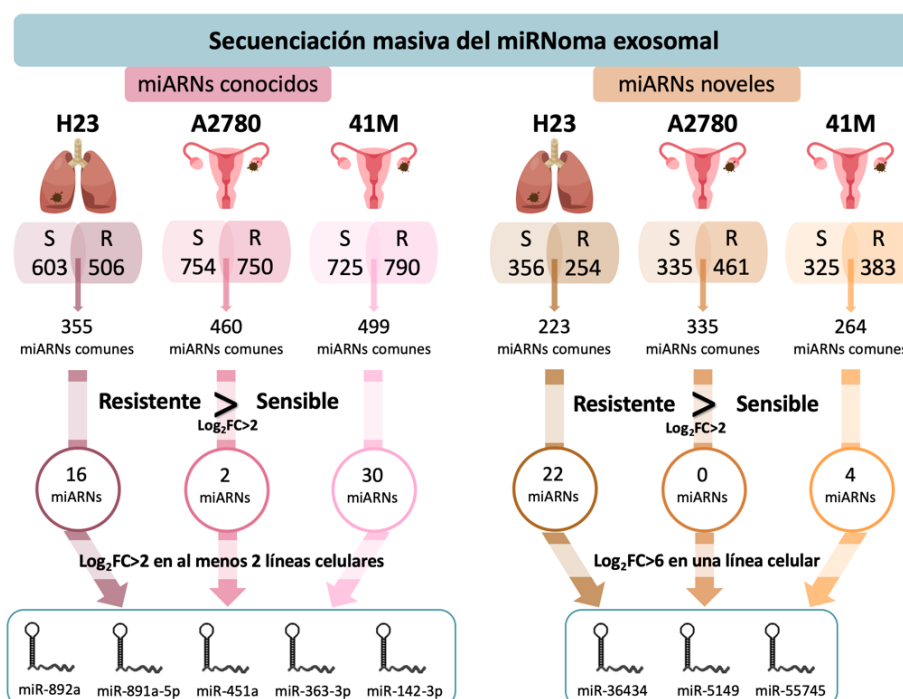


Figura 24. Selección de miARNs sobre-representados en exosomas procedentes de células con fenotipo resistente a CDDP en comparación con los procedentes de células sensibles. Los datos se obtuvieron mediante secuenciación masiva por small RNAseq y se seleccionaron por dos vías según fueran miARNs conocidos (**izquierda**) o noveles (**derecha**).

3.2 Identificación de un miARN endógeno específico del contenido exosomal

Al validar los resultados del small RNA-seq por una técnica dirigida alternativa, la PCR cuantitativa, nos dimos cuenta de la necesidad que existe de un endógeno específico exosomal que permita la correcta normalización de los niveles de los miARNs de estudio. Actualmente no existe ninguno comercial con estas características ni encontramos en la literatura miARNs robustos procedentes del compartimento exosomal que justificaran su uso en nuestro trabajo. Los endógenos más frecuentemente utilizados para normalizar los miARNs exosomales en cáncer y en otras patologías, son el miR-16 y los RNA nuclear pequeño (snRNA) U6 o RNU6B, que no proceden del compartimento exosomal y que a menudo no se valida su homogeneidad en estas nanovesículas.

Por lo tanto, nos propusimos identificar, a partir de los resultados obtenidos en la secuenciación masiva del microRNoma exosomal procedente de nuestro modelo experimental, un miARN que pudiera ser utilizado como endógeno exosomal en cáncer. Para ello, comparamos el perfil de miARNs de las seis líneas celulares, con el fin de identificar candidatos que se mantuvieran invariables entre dos tipos de tumores diferentes (pulmón y ovario) y entre condiciones farmacológicas distintas (expuestas y no expuestas a platino).

Los miARNs obtenidos en el small RNAseq que presentaban al menos un recuento por millón de lecturas en todas las condiciones experimentales y muestras, se ordenaron siguiendo dos criterios: (1) que presentaran las menores diferencias entre los fenotipos resistente y sensible (\log_2FC R vs S) y (2) que tuvieran niveles altos de expresión en todas las líneas celulares (TPM). La **Tabla 9** muestra un listado de los 9 primeros miARNs identificados en el análisis siguiendo dichos criterios. Además, comprobamos la expresión de los miARNs del listado en 30 tipos tumorales diferentes procedentes de la base de datos TCGA (del inglés, The Cancer Genome Atlas) para aumentar la robustez de los candidatos elegidos. Seleccionamos los cuatro miARNs con una variabilidad menor o igual a 0,26 entre nuestro modelo de células S y R. De esos cuatro miARNs seleccionamos los dos que tenían niveles mayores de TPM y, entre los dos con TPM más bajos, el que menor variabilidad presentó en el TCGA. Los tres miARNs seleccionados con mayor probabilidad de éxito como potenciales controles endógenos exosomales fueron: miR-151a-3p, miR-22-5p y miR-221-3p.

Tabla 9. Listado de miARNs endógenos identificados por small RNAseq

Nombre miARN	Número de acceso	Media variabilidad entre S y R ($ \log_2FC\ RvsS $)	Suma de los niveles de expresión en todas las líneas (TPM)	\log_2 (Expresión media) variabilidad en 30 tipos tumorales (TCGA)
hsa-miR-151a-3p	MI0000809	0,084	40554	0,32
hsa-miR-22-5p	MI0000078	0,169	236	0,58
hsa-miR-502-3p	MI0003186	0,193	237	0,61
hsa-miR-221-3p	MI0000298	0,257	5110	1,67
hsa-miR-1183	MI0006276	0,276	675	-
hsa-miR-27a-3p	MI0000085	0,278	4486	6,67
hsa-let-7i-5p	MI0000434	0,300	57519	0,60
hsa-miR-411-5p	MI0003675	0,323	325	3,05
hsa-miR-196b-5p	MI0001150	0,329	522	3,67

Los niveles de los tres candidatos fueron validados por qRT-PCR en los exosomas de las líneas celulares de nuestro modelo experimental (H23S/R, A2780S/R y 41M/R) y de siete líneas celulares adicionales de diversos tipos tumorales: H1299 y H727 (pulmón), HT29 y LoVo (colon), IMIMPC2 y PANC1 (páncreas) y MCF7 (mama). De entre los candidatos analizados, el miR-151a es el que menor variabilidad presenta entre las diferentes muestras, con una desviación típica (DT) de 1,66 ciclos, en comparación con los otros dos endógenos candidatos (**Figura 25A-C**). Adicionalmente, valoramos la homogeneidad del miR-16, observando una mayor variabilidad en sus niveles entre las mismas líneas celulares que el miR-151a (DT= 2,10) (**Figura 25D**). Para determinar si los niveles de cualquier miARN de interés variaban en función de utilizar el candidato endógeno miR-151a o el miR-16, analizamos los niveles del miR-451a en las parejas de líneas celulares H23S/R, A2780S/R y 41M/MR, normalizándolos frente a ambos endógenos. Se observaron diferencias en los niveles absolutos debido a que los ciclos de amplificación del miR-151a y el miR-16 son diferentes, sin embargo, existe una correlación estadísticamente significativa ($p=0.042$) entre los datos con un coeficiente de correlación $R=0,829$ (**Figura 25E**).

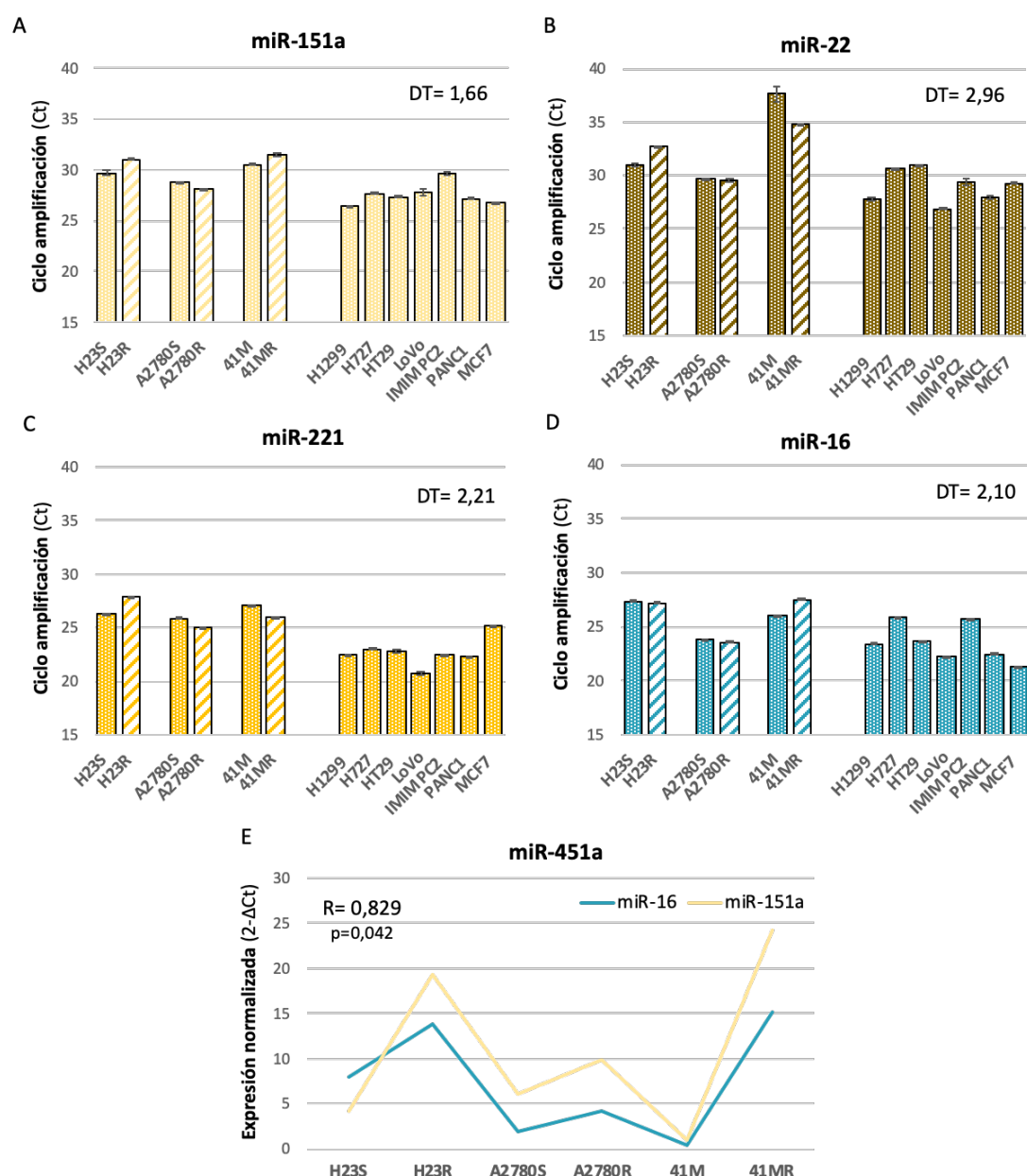


Figura 25. Ciclos de amplificación de los miARNs endógenos exosomales. miARNs endógenos candidatos (A-C) y endógeno celular miR-16 (D) cuantificados por qRT-PCR con sondas TaqMan™ (Tabla 6) en los exosomas del secretoma de las líneas celulares tumorales pareadas sensibles y resistentes a cisplatino H23S/R, A2780S/R, 41M/R y siete líneas adicionales de diferentes tipos tumorales H1299, H727, HT29, LoVo, IMMPC2, PANC1 y MCF7. DT= desviación típica del valor medio del ciclo de amplificación. (E) Niveles normalizados del miR-451a frente a los endógenos miR-151a y miR-16. R: coeficiente de correlación. Test de correlaciones no paramétricas de Spearman.

3.3 Validación dirigida de los miARNs candidatos

Una vez escogido el miR-151a como el endógeno exosomal más homogéneo para la normalización de los niveles de los miARNs candidatos seleccionados, llevamos a cabo la validación por qRT-PCR utilizando sondas TaqMan™ (**Tabla 6**). Para ello, evaluamos los cambios en los niveles de los cinco miRNAs seleccionados conocidos (miR-892a, miR-891a-5p, miR-451a, miR-363-3p y miR-142-3p) y de los tres miRNAs noveles (miR-36434, miR-5149 y miR-55745) en los exosomas procedentes de las tres parejas de líneas celulares sensibles y resistentes a CDDP H23S/R, A2780S/R y 41M/R.

En el caso de los miARNs conocidos, se validó la sobre-representación de los miR-451a y miR-142-3p en los exosomas del fenotipo resistente de la línea de CPNM H23 en comparación con el fenotipo sensible. No se observaron diferencias en los miR-892a y 891a-5p entre los dos fenotipos y no se detectó amplificación del miR-363-3p (**Figura 26A, panel izquierdo**). En ambas líneas de cáncer de ovario A2780 y 41M se validó el aumento de los niveles de los miR-891a-5p y 451a en los exosomas de los subtipos resistentes frente a los sensibles, mientras que no se observaron diferencias en el miR-892a entre los dos subtipos. En los miR-363-3p y 142-3p no se validaron los cambios observados en sus niveles en la línea A2780 y no se detectó amplificación de estos dos miARNs en ninguno de los fenotipos de la línea 41M (**Figura 26B y C, panel izquierdo**).

Con respecto a los miARNs desconocidos, la sobre-representación del miR-55745 en los exosomas del subtipo resistente en comparación con el sensible se validó en las tres líneas celulares. Por el contrario, en la línea H23, se observaron niveles más bajos del miR-36434 en el fenotipo resistente y no se detectó amplificación del miR-5149 en ninguno de los fenotipos de esta línea. En las dos líneas de cáncer de ovario A2780 y 41M no se observaron diferencias entre los niveles de los miARNs 5149 y 36434 entre los fenotipos de resistencia y sensibilidad (**Figura 26A-C, panel derecho**).

Para determinar si el papel de los miARNs validados por qRT-PCR (miR-451a, 142-3p, 891a-5p y 55745) en la resistencia a cisplatino podría extenderse a la respuesta a otros compuestos derivados del platino, analizamos sus niveles en los exosomas de los subtipos celulares resistentes a carboplatino H23R-CBDCA y A2780R-CBDCA. En cada uno de los casos se cuantificaron los niveles de aquellos miARNs cuya sobre-representación se había confirmado en el correspondiente fenotipo resistente a cisplatino. Los resultados confirmaron la sobre-representación de tres de los cuatro candidatos. El miRNA 142-3p en la línea H23 resistente al

carboplatino y los miARNs 891a-5p y 55745 en la línea A2780 resistente al carboplatino. No se observaron diferencias en los miR-451a y miR-55745 en las células H23 (**Figura 26D**), ni en el miR-451a en las células A2780. (**Figura 26E**).

Los resultados derivados de la validación de los niveles de los miARNs exosomales por qRT-PCR nos permitieron seleccionar un total de cuatro miARNs candidatos potencialmente implicados en la resistencia a CDDP: miR-451a, miR-55745, miR-142-3p y miR-891a-5p, tres de los cuales también se confirmaron en resistencia a CBDCA. Los miARNs 451a y 55745 se comparten entre la línea de cáncer de pulmón H23 y las líneas de cáncer de ovario A2780 y 41M. El miR142-3p estaría potencialmente implicado en el mecanismo de resistencia específicamente en cáncer de pulmón y el miR-891a-5p en cáncer de ovario.

3.4 Ensayos funcionales de sobreexpresión con miARNs sintéticos

A continuación, estudiamos la implicación de los candidatos validados en el desarrollo de resistencia a cisplatino, a través de su sobreexpresión en nuestros modelos celulares y la posterior exposición a CDDP. En primer lugar, cuantificamos los niveles de expresión basal de dichos candidatos en el ARN total de las células sensibles y resistentes previo a la transfección. En la línea celular H23 los resultados indican una mayor expresión del miR-142-3p en el fenotipo resistente en comparación con el fenotipo sensible. En el caso del miR-891a-5p, se observó en la línea celular 41MR una mayor expresión que en su línea celular parental sensible 41M, sin embargo, en la línea celular A2780 no hubo diferencias entre los dos fenotipos. Asimismo, el miR-55745 no presentó diferencias entre los dos subtipos en ninguna de las líneas celulares y no se detectó amplificación del miR-451a en ningún caso (**Figura 27A-C**).

En segundo lugar, sobreexpresamos los miARNs candidatos en los subtipos sensibles y resistentes y evaluamos la respuesta a cisplatino en comparación con las células transfectadas con el control negativo. Para ello transfectamos cada línea celular sensible y resistente con los miARNs sintéticos o “mimics” correspondientes según la validación observada por qRT-PCR: células H23 con los miR-451a, miR-55745 y miR-142-3p; y células A2780 y 41M con los miR-451a, miR-55745 y miR-891a-5p. La concentración adecuada de los mimics se determinó en un ensayo piloto transfectando concentraciones de 20, 30, 40 y 50 nM del miR-451a en la línea celular 41M. Los resultados se cuantificaron con qRT-PCR, observándose que con la dosis de 20 nM se alcanzaban niveles del orden de 10⁶ veces más elevados que en el control negativo, que se mantenían con el resto de las dosis (**Figura 28A**).

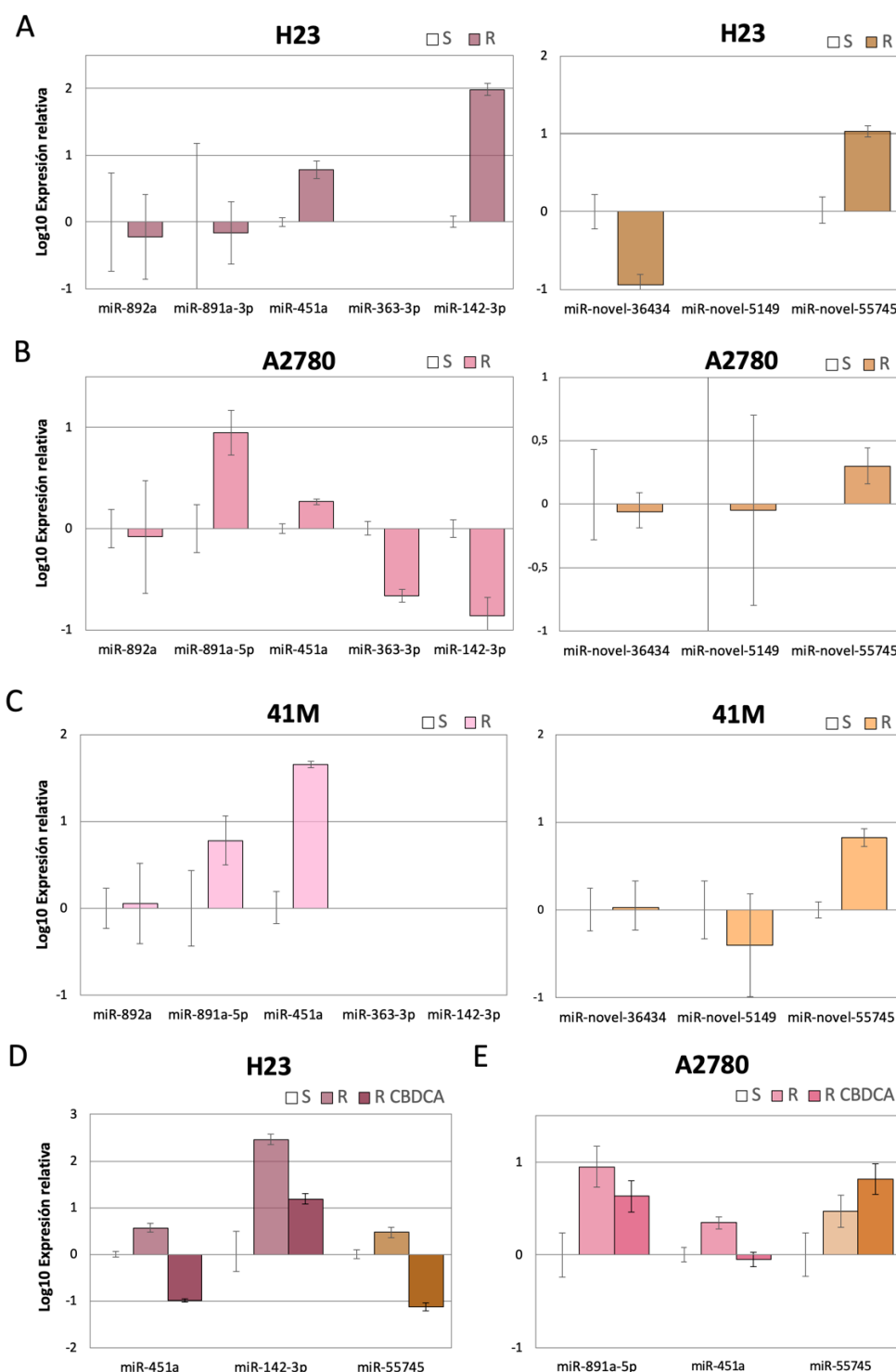


Figura 26. Niveles de expresión relativa de los miARNs exosomales candidatos cuantificados por qRT-PCR con sondas TaqMan™ descritas en la Tabla 6. Los niveles se muestran en las líneas pareadas sensibles y resistentes a CDDP de CPNM H23 (A) y de cáncer de ovario A2780 (B) y 41M (C), así como en las líneas pareadas sensibles y resistentes a CBDCA H23 (D) y A2780 (E). Los niveles del fenotipo sensible se utilizaron como calibrador en todos los casos y representan la media \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado para cada línea celular analizada. El miR-151a se utilizó como miARN endógeno exosomal para la normalización. La ausencia de barras indica que no hubo amplificación en la PCR.

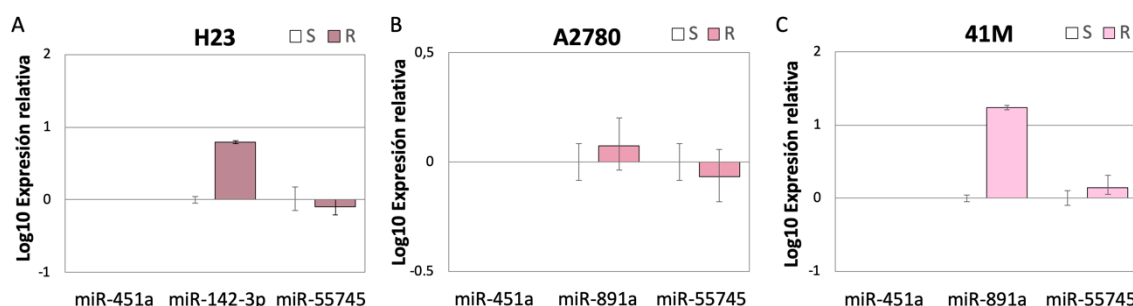


Figura 27. Niveles basales de expresión relativa de los miARNs candidatos. Cuantificación en el ARN total de las líneas celulares H23 (A), A2780 (B) y 41M (C). El miR-151a se utilizó como endógeno para la normalización. La expresión del fenotipo sensible se utilizó como calibrador en cada caso y representan la media \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado para cada línea celular analizada.

La transfección con la dosis de 20 nM no afectó a la viabilidad celular en la línea 41M y produjo un descenso del 18% en la viabilidad de las células H23. Sin embargo, se observó una mortalidad asociada a esta dosis del 40% del cultivo con las células A2780 (**Figura 28B**). Por ello, ajustamos la concentración en la línea A2780S a 10 nM, obteniendo la sobreexpresión esperada del miARN (**Figura 28C**) pero disminuyendo la viabilidad a un 15% (**Figura 28D**).

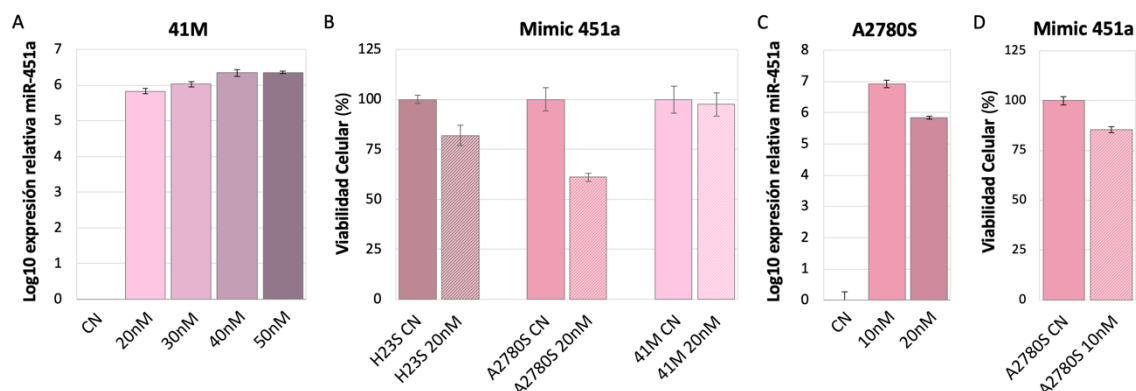


Figura 28. Determinación de la dosis óptima de miARNs sintéticos para los ensayos de transfección. (A) Niveles de expresión relativos representados en la escala log10 del miR-451a en la línea celular 41M tras la transfección con 20, 30, 40 y 50 nM del miR sintético. La línea celular 41M transfectada con el control negativo (CN) se utilizó como calibrador. (B) Viabilidad celular de las líneas celulares sensibles H23S, A2780S y 41M tras la transfección con 20 nM del mimic 451a. Los datos se normalizaron con respecto a cada línea transfectada con el CN, que se estableció como el 100%. (C) Niveles de expresión relativos representados en escala log10 del miR-451a en la línea celular A2780S tras la transfección con 10 y 20 nM del mimic. Las células A2780S transfectadas con el CN se utilizaron como calibrador. (D) Viabilidad celular de la línea A2780S tras la transfección con 10 nM del mimic 451a. El porcentaje de la línea celular tratada con el mimic 451a se normalizó con respecto a la línea transfectada con el CN, que se estableció como el 100%. El miR-151a se utilizó como endógeno para la normalización.

La sobreexpresión del miR-451a en los subtipos sensibles H23S, A2780S y 41M no produjo cambios en la viabilidad de las células a cisplatino, mientras que en los subtipos resistentes H23R, A2780R y 41MR, se observó una tendencia hacia un aumento de la sensibilidad al fármaco con respecto a las células transfectadas con el control negativo en los tres casos, siendo más pronunciada en el caso de la línea celular 41MR (**Figura 29A, D y G**). La sobreexpresión del miARN novel 55745, indujo una ligera sensibilización de la línea 41MR al cisplatino, efecto que no se observó en el resto de las líneas celulares (**Figura 29B, E y H**), de la misma manera que en el caso del miR-142-3p en las líneas celulares H23S y R (**Figura 29C**). Por último, la sobreexpresión del miR-891a-5p en las líneas celulares de cáncer de ovario A2780S/R y 41M/MR produjo un descenso de la viabilidad a cisplatino en todos los casos (**Figura 29F e I**). La eficacia de la transfección se validó en todos los casos mediante qRT-PCR, lo que confirma la sobreexpresión de todos los miARNs tras 72 h en todas las líneas celulares (**Figura 29J, K y L**).

3.5 Análisis del proteoma exosomal e identificación de proteínas candidatas como biomarcadores de resistencia a CDDP

Para identificar proteínas exosomales potencialmente implicadas en la inducción de resistencia a cisplatino analizamos el contenido de los exosomas procedentes del secretoma de las células pareadas sensibles y resistentes H23S/R, A2780S/R y 41M/R con un estudio proteómico *shotgun* mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) en colaboración con el grupo de proteómica del CNB. La identificación de las proteínas a partir de los resultados proteómicos se hizo utilizando el motor de búsqueda Mascot y se obtuvieron un total de 643 y 664 proteínas en H23S y H23R; 883 y 690 en A2780S y A2780R; y 796 y 705 en 41M y 41MR (**Anexo 2**). Además, en todas las muestras se identificó un amplio número marcadores exosomales presentes en el listado de 100 proteínas exosomales recogidas en la base de datos ExoCarta: 62 en H23S, 63 en H23R, 69 en A2780S, 67 en A2780R, 78 en 41M y 66 en 41MR (**Anexo 2**).

Para el análisis semicuantitativo de las proteínas se utilizó el programa Scaffold y se incluyeron las 549 proteínas identificadas con al menos dos péptidos, para aumentar la robustez del análisis. Con dicha aproximación se estimaron las diferencias entre cada pareja de líneas celulares sensible y resistente en base al número de espectros identificados para cada péptido. Se encontraron 131 proteínas sobre-representadas en los exosomas del subtipo resistente H23R, 122 en A2780R y 126 proteínas en 41MR, en todos los casos en comparación con el correspondiente subtipo sensible.

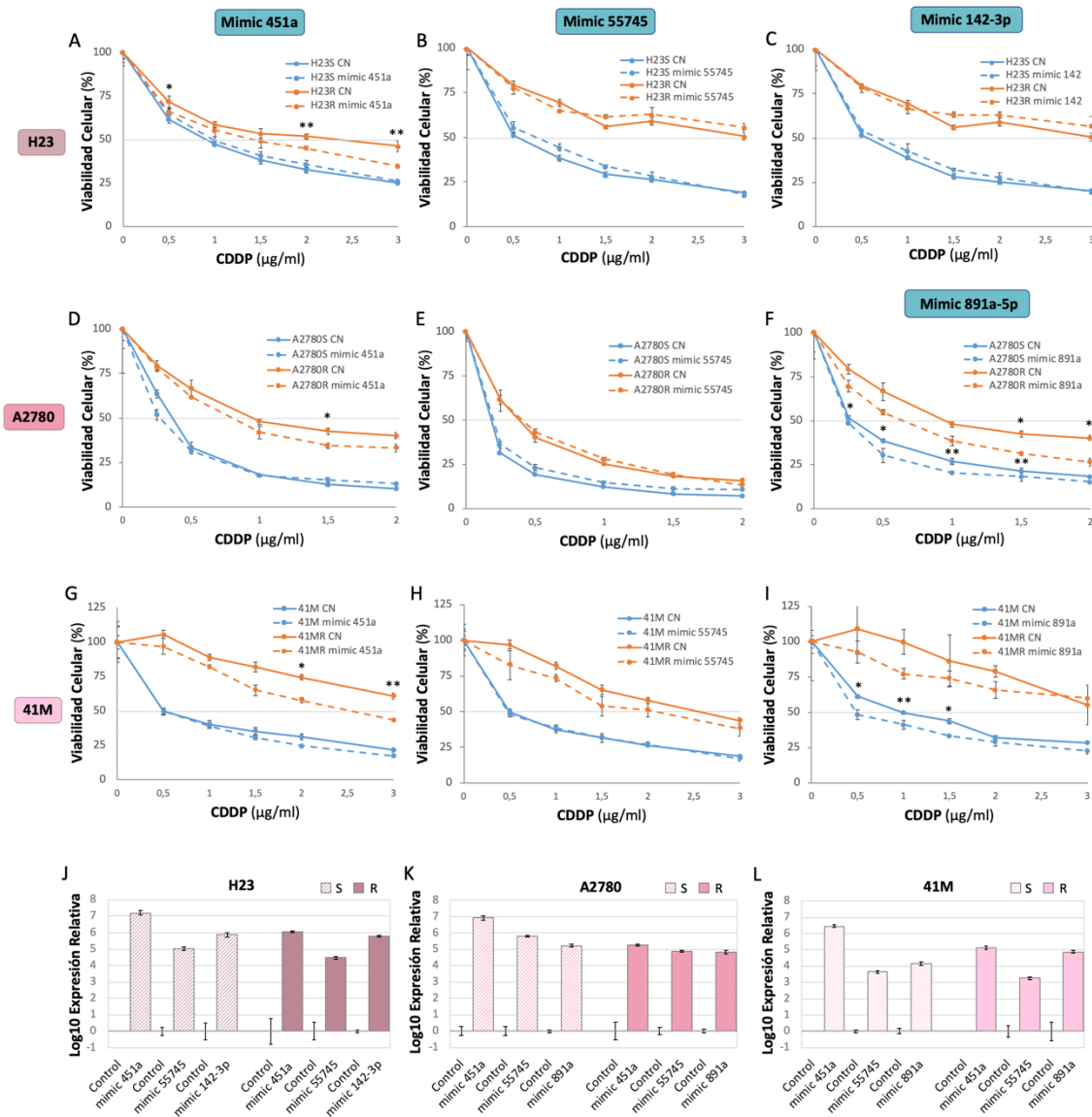


Figura 29. Efecto de la sobreexpresión de los miARNs candidatos en la viabilidad a cisplatino. Ensayo de viabilidad celular en líneas celulares H23 (A, B y C), A2780 (D, E y F) y 41M (G, H e I) transfectadas con 20, 10 y 20 nM respectivamente del control negativo (CN) o del precursor de cada miARN (mimic): miR-451a (A, D y G), miR-55745 (B, E y H), miR-142-3p (C) y miR-891a-5p (F e I). Los datos se normalizaron para cada control no tratado y representan la media \pm desviación estándar de al menos 2 experimentos independientes realizados por cuadruplicado para cada línea celular analizada. (J, K y L) Niveles de expresión relativos de los miARNs medidos por qRT-PCR en las líneas celulares H23, A2780 y 41M, representados en la escala log10. En cada caso se utilizó la línea celular transfectada con el control negativo como calibrador. El miR-151a se utilizó como endógeno para la normalización. **= $p < 0,001$; *= $p < 0,01$ Prueba t de Student, comparando las células transfectadas con cada mimic, con el mismo subtipo celular transfectado con el CN.

Para mejorar la solidez de nuestra selección y encontrar candidatos robustos para su posterior uso clínico, seleccionamos las 22 proteínas compartidas por al menos dos de las tres líneas celulares, que además tuvieran una diferencia mayor o igual a 10 conteos entre los dos fenotipos en alguna de ellas (**Figura 30 y Tabla 10**). Además, profundizamos en el potencial papel de este grupo de proteínas analizando los procesos biológicos en los que participan de manera conjunta. Para ello realizamos un análisis ontológico con la herramienta DAVID (del inglés, Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)¹⁸⁸ de las 22 proteínas candidatas que reveló que al menos 6 de ellas participan en procesos biológicos relacionados con la organización y desestructuración de la matriz extracelular (MEC) y con la adhesión celular ($p < 0,01$) (**Anexo 3**).

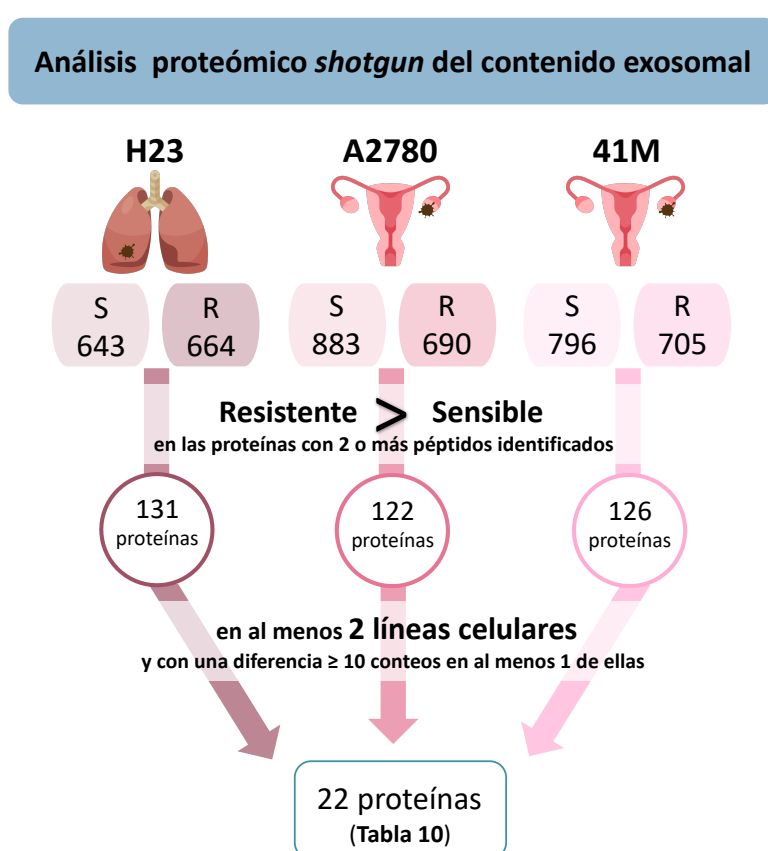


Figura 30. Selección de proteínas exomales promotoras de resistencia a CDDP. Selección a partir de los datos obtenidos tras el análisis proteómico *shotgun* en las líneas celulares de cáncer de pulmón H23S/R y de cáncer de ovario A2780S/R y 41M/MR.

Tabla 10. Listado de las 22 proteínas candidatas seleccionadas a partir del análisis proteómico *shotgun* en líneas celulares.

Nombre del gen	Descripción	Uniprot ID	Peso Molecular (kDa)	Nombre del gen	Descripción	Uniprot ID	Peso Molecular (kDa)
POSTN	Periostina	Q15063	93	HBA	Subunidad alfa de la hemoglobina	P69905	15
MFGE8	Lactadherina	Q08431	43	GSN	Gelsolina	P06396	86
A2M	Alfa 2 macroglobulina	P01023	163	NID1	Nidógeno 1	P14543	136
ITIH1	Cadena pesada 1 del Inhibidor de la inter-alfa-tripsina	P19827	101	NID2	Nidógeno 2	Q14112	151
ITIH2	Cadena pesada 2 del Inhibidor de la inter-alfa-tripsina	P19823	106	C1QTNF3	Proteína 3 relacionada con el factor de necrosis tumoral C1q del complemento	Q9BXJ4	27
APOE	Apolipoproteína E	P02649	36	AFP	Fetoproteína alfa	P02771	69
TNC	Tenascina	P24821	241	TSP1	Trombospondina 1	P07996	129
AGRN	Agrina	O00468	217	FBN1	Fibrilina 1	P35555	312
LOXL2	Lisil oxidasa homóloga 2	Q9Y4K0	87	FBN2	Fibrilina 2	P35556	315
COL5A2	Colágeno 5 cadena alfa 2	P05997	145	ACTBL	Proteína 2 similar a la beta actina	Q562R1	42
HSPG2	Proteína central del proteoglicano heparan sulfato específico de membrana basal	P98160	469	TBB6	Tubulina beta 6	Q9BUF5	50

PARTE 4. ESTUDIO TRASLACIONAL DE LOS miARNs Y PROTEÍNAS EXOSOMALES COMO POTENCIALES MARCADORES DE USO CLÍNICO

4.1 Características de las cohortes de estudio y tablas demográficas

Para determinar la relevancia clínica de los miARNs y proteínas exosomales identificadas, se recogieron durante un periodo de tres años, 51 muestras prospectivas de plasma de pacientes con CPNM en estadios avanzados (III y IV) procedentes del Hospital Universitario La Paz (**Tabla 11**). Todas las muestras fueron extraídas antes de recibir ningún tratamiento y posteriormente, todos los pacientes recibieron quimioterapia basada en platino (cisplatino o carboplatino) como primera línea de tratamiento, que se combinó con Vinorelbina en los pacientes con carcinoma epidermoide y con Pemetrexed o Paclitaxel + Bevacizumab en los pacientes con adenocarcinoma. Durante los tres años se realizó un seguimiento de los pacientes para registrar los parámetros clínicos necesarios par el desarrollo de este estudio. Las características clinicopatológicas de cada individuo se recogen en la **Tabla 12**.

Tabla 11. Tabla demográfica con las características clínico-patológicas de la cohorte de 51 muestras del Hospital Universitario La Paz

Características	Cohorte 51 pacientes CPNM	
	N	%
Edad (media, rango)	66 (47-83)	-
Sexo		
Femenino	18	35,3
Masculino	33	64,7
Tipo histológico		
Adenocarcinoma	29	56,9
Célula grande	1	2
Epidermoide	12	23,5
No determinado	9	17,6
Estadio		
IIIA	9	17,6
IIIB	11	21,5
IIIC	2	4
IV	26	51
No determinado	3	5,9
Cirugía		
Si	4	7,8
No	47	92,2
Tabaquismo		
Fumador	17	33,3
Ex fumador	31	60,7
No fumador	2	4
Régimen QT		
Cisplatino	24	47
Carboplatino	27	53

La recogida de muestras prospectivas pareadas de plasma y líquido ascítico de pacientes con cáncer de ovario del Hospital Universitario La Paz, no se pudo iniciar hasta la última etapa del trabajo, por lo que la cohorte consta de 20 muestras pareadas procedentes de 10 pacientes (**Tabla 13**). La mayoría de ellas presentaron carcinoma seroso de alto grado en estadio avanzado (III y IV) y recibieron un esquema de quimioterapia basada en carboplatino en combinación con Paclitaxel. Este número reducido de pacientes no es suficiente para profundizar en el papel traslacional de nuestros candidatos en cáncer de ovario, pero sin embargo son datos de gran valor para esclarecer el papel como endógeno universal de origen exosomal de nuestros candidatos, como se expone en el siguiente apartado.

Tabla 12. Datos clínico-patológicos de la cohorte de 51 pacientes con CPNM del Hospital Universitario La Paz.

Paciente	Sexo	Edad (años)	Tipo Histológico	Estado	Esquema QT	Niveles normalizados miARNs (2-ΔCt)				Niveles proteínas (Intensidad)										Fecha inicio QT	Fecha evaluación recaída	Estado recaída	Fecha último contacto	Estado	
						miR-451a	miR-142	miR-557/45	LOXL2	GELS	FBN2	A2MG	ITIH1	ITIH2	TSP1	APOE	TENA	HBA							
A1	H	69	Epidermoide	IV	CDDP	913,97	23,12	2,15	1819547	25422	356202	429783	46119	49963	526912	11489023	136884	1469527	2/10/15	3/12/15	Exitus	3/12/15	Exitus	3/12/15	Exitus
A2	M	61	AdenoCa	IV	CBDCA	57,84	0,41	0,83	2840	720	379	4018	99	466	2897	2957	720	3012	5/10/15	23/11/16	Si	19/12/16	PS		
A3	H	69	AdenoCa	IV	CDDP	578,43	19,74	4,11	12209220	852134	1057499	2881878	76302	77937	1441962	91201878	364569	2737401	5/10/15	6/10/16	Si	5/2/17	Exitus		
A4	H	64	AdenoCa	IV	CDDP	1258,07	33,82	4,79	6862070	441887	814829	3270281	114238	121470	496577	254553552	215543	16807198	15/10/15	14/12/15	Si	13/3/16	Exitus		
A5	M	55	AdenoCa	IV	CBDCA	451,32	13,28	2,69	9394108	510219	1071578	8694154	146347	154017	950749	194923100	1155555	1931007	15/10/15	2/6/16	Si	20/3/17	Exitus		
A6	H	58	AdenoCa	IIIB	CDDP	690,26	39,75	2,66	8420604	467676	858632	2548822	70984	84566	1723172	357972768	136298	1825892	28/10/15	1/3/16	Exitus	1/3/16	Exitus		
A7	H	59	ND	IIIB	CBDCA	1352,11	26,83	14,32	9600738	578446	944157	5395079	200078	254696	359446	181619728	161213	759292	4/11/15	22/11/15	Exitus	22/11/15	Exitus		
A8	H	71	Epidermoide	IIIB	CBDCA	731,14	13,81	1,43	9537501	583527	889912	19703276	148559	212687	615821	185262652	296237	1790299	18/11/15	2/5/16	Exitus	2/5/16	Exitus		
A9	H	62	Epidermoide	IIIB	CBDCA	2018,41	4,98	0,54	9980304	577784	978610	6438345	118641	166333	3357162	849069888	598248	2383486	2/12/15	4/5/16	Exitus	8/3/17	Exitus		
A10	H	79	Epidermoide	IIIC	CDDP	1632,65	12,96	6,26	10968392	592619	929044	3543913	31830	26857	461709	48566326	63463	91484	28/1/16	3/2/17	Si	2/8/18	Vivo		
A11	H	82	Célula grande	ND	CBDCA	215,72	1,79	0,54	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	1/2/16	5/4/18	No	5/4/18	Vivo		
A12	H	78	AdenoCa	IV	CBDCA	168,43	13,83	3,40	293324	13007	29332	3333656	30868	30652	85656	98620132	286586	320309	17/2/16	17/5/17	Si	4/4/18	Vivo		
A13	M	52	AdenoCa	IIIB	CBDCA	438,67	6,88	1,30	53573	9311	20476	5791603	43866	58516	34764	106759346	103786	72715	24/2/16	10/3/17	Si	25/4/18	Vivo		
A14	H	65	AdenoCa	IIIA	CDDP	879,78	14,83	1,96	172886	13178	51016	10807303	84980	116665	2606194	40033709	3087460	754291	29/2/16	2/4/18	No	2/4/18	Vivo		
A15	M	54	Epidermoide	IIIA	CDDP	136,81	1,80	1,44	127688	24310	13670	14558014	158957	157930	4386052	149262092	722534	1487738	2/3/16	10/2/17	Si	27/3/18	Exitus		
A16	M	71	AdenoCa	IV	CBDCA	1074,17	34,58	2,58	131302	23739	25860	6257556	52062	30045	1218410	44685809	510958	346371	7/3/16	27/10/16	Si	29/12/17	Exitus		
A17	M	75	AdenoCa	IIIB	CDDP	523,48	19,43	3,32	134023	57463	15461	8323278	80417	128340	321187	73550646	569367	199228	9/3/16	11/4/18	No	11/4/18	Vivo		
A18	H	58	ND	IV	CBDCA	296,73	8,42	4,78	98977	112856	56712	9022558	106739	118600	993465	80009114	521237	577256	1/2/16	30/7/16	Si	12/8/16	Exitus		
A19	H	70	AdenoCa	IIIA	CDDP	269,474	21,35	1,13	12544443	832283	611084	4116677	33220	44492	43012	143102540	48463	86826	23/5/16	14/3/18	No	14/3/18	Vivo		
A20	H	47	ND	ND	CBDCA	2906,36	61,14	0,97	2291798	1296060	888110	7070809	108546	168365	1335534	34195068	1762979	1139145	8/6/16	13/6/16	Exitus	13/6/16	Exitus		
A21	M	49	AdenoCa	IV	CBDCA	327,65	10,41	1,29	20228324	1183655	862264	2278500	52705	98448	2886646	146243596	145133	266236	20/6/16	16/11/16	Si	19/1/17	Exitus		
A22	H	66	ND	IV	CDDP	378,72	13,30	1,51	1792790	1124686	795035	13478732	128553	169729	4435949	80619834	590763	1013834	28/6/16	14/8/16	Exitus	14/8/16	Exitus		
A23	H	61	Epidermoide	IV	CBDCA	148,16	13,78	1,59	17191782	1099335	794782	9591870	149908	161954	1720465	111000252	791757	133421	14/7/16	25/8/16	Si	4/9/16	Exitus		
A24	H	70	ND	IV	CBDCA	69,79	1,18	2,28	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	18/7/16	23/12/16	Si	14/1/17	Exitus		
A25	H	68	ND	ND	CBDCA	1063,05	25,99	3,18	5112163	335421	578837	559151	3952	880	25198	8283739	18849	10802	8/8/16	16/4/18	No	16/4/18	Vivo		

H: hombre; M: mujer; AdenoCa: adenocarcinoma; ND: no determinado; CBDCA: carboplatino; CDDP: cisplatino; MI: muestra insuficiente; QT: quimioterapia; PS: pérdida de seguimiento.

Tabla 12. Continuación

Paciente	Sexo	Edad (años)	Tipo Histológico	Estado	Esquema QT	Niveles normalizados miARNs (2 ^{-ΔCt})										Niveles proteínas (Intensidad)										Fecha inicio QT	Fecha evaluación recálida	Estado recálida	Fecha último contacto	Estado
						miR-451a	miR-142	miR-55745	LOXL2	GELS	FBN2	A2MG	ITIH1	ITIH2	TSP1	APOE	TENA	HBA												
A26	H	58	Epidermoide	IV	CBDCA	1438,15	58,36	4,67	17286778	993959	676771	5649992	69558	82865	114419	234964544	356631	736438	9/8/16	15/9/16	Exitus	15/9/16	Exitus	15/9/16	Exitus					
A27	M	55	Epidermoide	IIIB	CCDP	4003,37	6,44	1,73	13252875	825372	577166	4563585	46418	11659	4022277	28256422	559261	6964882	8/9/16	5/1/17	Si	5/1/17	Si	14/3/17	Exitus					
A28	H	75	AdenoCa	IV	CCDP	468,53	12,84	0,42	15654625	994952	653309	4069942	126128	171212	1100374	142575284	154661	624614	19/9/16	10/4/17	Si	10/4/17	Si	21/10/17	Exitus					
A29	H	47	AdenoCa	IV	CBDCA	2219,47	21,75	3,34	13591515	913140	577312	6661457	187527	317041	467898	116975368	798137	559644	26/9/16	16/11/16	PS	16/11/16	PS	16/11/16	Exitus					
A30	M	74	AdenoCa	IV	CCDP	1373,84	14,38	0,70	13053931	860267	550779	5938055	66518	76236	280466	79037412	720073	43081	18/10/16	9/2/17	Si	9/2/17	Si	14/2/17	Exitus					
A31	H	74	AdenoCa	IV	CCDP	513,42	9,77	0,42	1037501	36176	7669	17407575	173551	260375	649465	61250853	931982	2148242	2/11/16	6/10/17	Si	6/10/17	Si	23/7/18	Vivo					
A32	M	69	Epidermoide	IIIA	CCDP	2507,44	14,53	0,27	940341	100616	35533	8055717	71860	86466	6334702	73740976	599881	10532778	16/11/16	8/12/16	Exitus	8/12/16	Exitus	8/12/16	Exitus					
A33	M	63	AdenoCa	IIIB	CBDCA	595,10	6,81	0,48	1106555	47180	22024	10965014	144513	130195	2771203	193358680	413417	1008245	28/11/16	26/4/18	No	26/4/18	No	26/4/18	Vivo					
A34	H	60	AdenoCa	IV	CBDCA	396,45	11,87	0,41	1379860	57576	23764	7867927	208462	171347	183763	145222976	1203916	1344404	29/1/17	11/9/17	Si	11/9/17	Si	30/9/17	Exitus					
A35	H	69	Epidermoide	IV	CCDP	2114,35	24,00	3,26	543150	14334	8898	983965	15194	6203	49447	38325291	127694	257167	16/3/17	26/7/17	Si	26/7/17	Si	12/9/17	Exitus					
A36	H	73	AdenoCa	IV	CBDCA	1203,48	20,03	1,26	1192772	45178	9665	1870372	22334	29685	309223	56417526	84446	2332689	5/4/17	12/4/18	No	12/4/18	No	12/4/18	Vivo					
A37	M	68	AdenoCa	IIIA	CCDP	1005,71	7,79	0,50	1279348	47447	6586	5696443	34549	45614	353415	81297702	101174	2402139	10/5/17	22/3/18	No	22/3/18	No	22/3/18	Vivo					
A38	M	66	AdenoCa	IIIB	CCDP	361,29	9,36	0,63	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	22/5/17	10/7/17	Si	23/9/17	Exitus	6/6/17	Exitus				
A39	H	75	AdenoCa	IV	CBDCA	246,08	17,33	1,01	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	19/5/17	6/6/17	Exitus	6/6/17	Exitus	6/6/17	Exitus				
A40	H	52	Epidermoide	IIIC	CCDP	1172,20	29,29	2,16	1136909	48181	22735	5771329	72867	66964	419296	71363440	359176	851116	14/6/17	20/4/18	Si	5/6/18	Si	5/6/18	Vivo					
A41	H	70	AdenoCa	IIIA	CBDCA	897,64	5,28	0,59	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	6/7/17	31/5/18	No	21/6/18	Vivo	21/6/18	Vivo				
A42	H	74	AdenoCa	IV	CBDCA	475,07	2,82	0,47	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	30/8/17	3/11/17	Si	21/11/17	Exitus	21/11/17	Exitus				
A43	H	67	AdenoCa	IIIA	CCDP	738,27	4,66	2,24	70772	2500	6363	5330759	69006	88454	653292	57432298	160416	1008310	17/10/17	23/4/18	No	23/4/18	No	23/4/18	Vivo					
A44	M	75	ND	IV	CBDCA	284,25	12,85	2,69	81736	1733	9253	2702532	36032	37010	113318	28728521	260878	196757	22/1/18	27/3/18	Si	19/5/18	Exitus	19/5/18	Exitus					
A45	H	70	AdenoCa	IV	CCDP	184,69	23,13	0,27	17404	1826	45671	5283164	64309	39295	95982	31061192	725604	204113	29/1/18	28/5/18	No	28/5/18	No	28/5/18	Vivo					
A46	H	73	AdenoCa	IIIB	CBDCA	1221,98	4,90	0,32	148607	45200	46752	13745965	257135	459394	842693	88095510	467943	755926	22/1/18	28/5/18	No	28/5/18	No	28/5/18	Vivo					
A47	M	62	Epidermoide	IIIB	CBDCA	584,07	9,40	1,19	29943	2342	22026	1807834	23483	31023	96351	30430079	90694	69453	25/1/18	27/4/18	Si	24/8/18	Exitus	24/8/18	Exitus					
A48	H	72	AdenoCa	IIIA	CBDCA	864,07	3,78	0,95	16748	1269	4389	1974971	19609	35212	79584	47637482	52900	227332	20/3/18	4/6/18	No	4/6/18	No	4/6/18	Vivo					
A49	H	56	Epidermoide	IV	CCDP	1398,82	6,67	1,01	44232	1392	3441	1400162	19288	26600	256340	140703052	66938	588930	9/4/18	3/6/18	No	3/6/18	No	3/6/18	Vivo					
A50	M	50	ND	IV	CCDP	4614,63	1,47	0,35	233881	49599	12649	3901699	123122	141933	345472	72505294	279876	16479979	17/4/18	9/7/18	No	9/7/18	No	9/7/18	Vivo					
A51	M	83	ND	IIIA	CBDCA	407,60	6,26	1,87	185307	19626	24704	8537450	120875	180468	268868	98777406	599134	1676835	19/4/18	7/6/18	Si	7/6/18	Si	7/6/18	Vivo					

H: hombre; M: mujer; AdenoCa: adenocarcinoma; ND: no determinado; CBDCA: carboplatino; CCDP: cisplatino; MI: muestra insuficiente; QT: quimioterapia; PS: pérdida de seguimiento.

Tabla 13. Datos clínico-patológicos de la cohorte de 10 pacientes con cáncer de ovario del Hospital Universitario La Paz.

Paciente	Edad (años)	Tipo Histológico	Estadio	Esquema QT	Estado recaída	Estado
OV1	78	HGSC	IV	CBDCA + Paclitaxel	No	Viva
OV2	78	HGSC	IV	CBDCA + Paclitaxel	No	Viva
OV3	50	HGSC	III	Olaparib	No	Viva
OV4	47	EC	III	-	No	Viva
OV5	56	-		FOLFOX + Panitumumab	Exitus	Exitus
OV6	59	HGSC	I	CBDCA + Paclitaxel	No	Viva
OV7	41	HGSC/gástrico	IV	-	No	Viva
OV8	53	HGSC	IV	CBDCA + Paclitaxel	No	Viva
OV9	61	Adenocarcinoma mucosecretor	III	-	Exitus	Exitus
OV10	49	HGSC	I	CBDCA + Paclitaxel	No	Viva

QT: quimioterapia; HGSC: Carcinoma seroso de alto grado; EC: Carcinoma endometroide; FOLFOX: Fluorouracilo + Ácido Folínico + Oxaliplatino.

4.2 Validación del panel de miARNs endógenos en biopsia líquida para la determinación del mejor miARN normalizador exosomal

Para poder evaluar el potencial de los miARNs candidatos como biomarcadores de respuesta a platino en la cohorte de pacientes con CPNM, en primer lugar, procedimos a validar el uso del miR-151a como endógeno exosomal en dichas muestras. Para ello extrajimos los exosomas y su contenido en ARN del plasma de 14 pacientes de nuestra cohorte de CPNM y analizamos por qRT-PCR los niveles de los tres endógenos exosomales candidatos identificados por small RNAseq que habían sido analizados en las líneas celulares: miR-151a, miR-22 y miR-221, así como del endógeno celular miR-16. Los resultados revelaron que, de la misma manera que se observó en las líneas celulares, el miR-151a es el candidato que menor variabilidad presenta entre las diferentes muestras, con una desviación típica (DT) de 1,39 ciclos, en comparación con los otros tres miARNs (**Figura 31A-D**). Posteriormente comprobamos que la normalización de los niveles del miR-451a en las muestras de pacientes presentaba variaciones en función del endógeno utilizado: miR-151a o miR-16, ya que no se observó una correlación entre los datos, con un coeficiente de correlación $R=0,411$, lo que indica que hay diferencias significativas entre normalizar frente a al miR-16 o frente al miR-151 (**Figura 30E**).

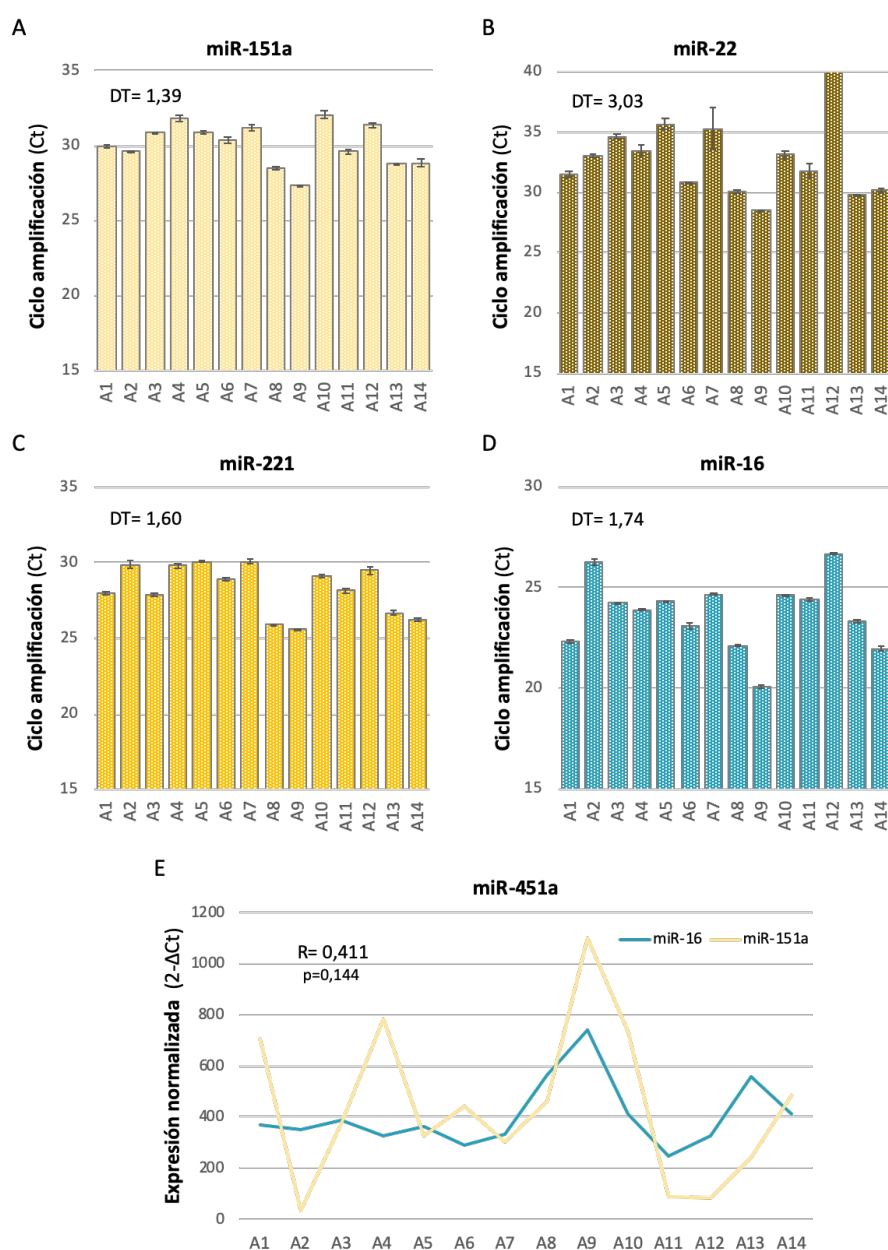


Figura 31. Ciclos de amplificación de los miARNs endógenos exosomales. miARNs endógenos candidatos (A-C) y miR-16 (D) cuantificados por qRT-PCR con sondas TaqMan™ (Tabla 6) en los exosomas del plasma sanguíneo de 14 pacientes con CPNM en estadios avanzados. DT= desviación típica del valor medio del ciclo de amplificación. (E) Expresión absoluta del miR-451a normalizado con los endógenos miR-151a y miR-16. R: coeficiente de correlación. Test de correlaciones no paramétricas de Spearman.

Por último, para estudiar el valor universal del miARN endógeno exosomal miR151a, valoramos su estabilidad en exosomas aislados del plasma de 10 voluntarios sanos (sin cursar patología de tumoral ni de ningún otro tipo en el momento de la extracción), de las 20 muestras pareadas de plasma y líquido ascítico de la cohorte de 10 pacientes de cáncer de ovario, y aumentamos el estudio en las 51 muestras de exosomas circulantes de pacientes con CPNM. La

RESULTADOS

homogeneidad del miR-151a se mantuvo en los exosomas extraídos de voluntarios sanos de la misma forma que en los pacientes de CPNM y de cáncer de ovario (**Figura 32A**), con desviaciones típicas (DT) de 1,01; 1,46 y 2,00 ciclos respectivamente. Por el contrario, al analizar en esas mismas muestras la homogeneidad de otro miARN, como el miR-451a, observamos, como era de esperar, gran variabilidad entre las diferentes muestras y condiciones patológicas, con una DT de 1,98 ciclos en las muestras de CPNM; 3,06 en cáncer de ovario y 1,55 en los controles sanos (**Figura 32B**).

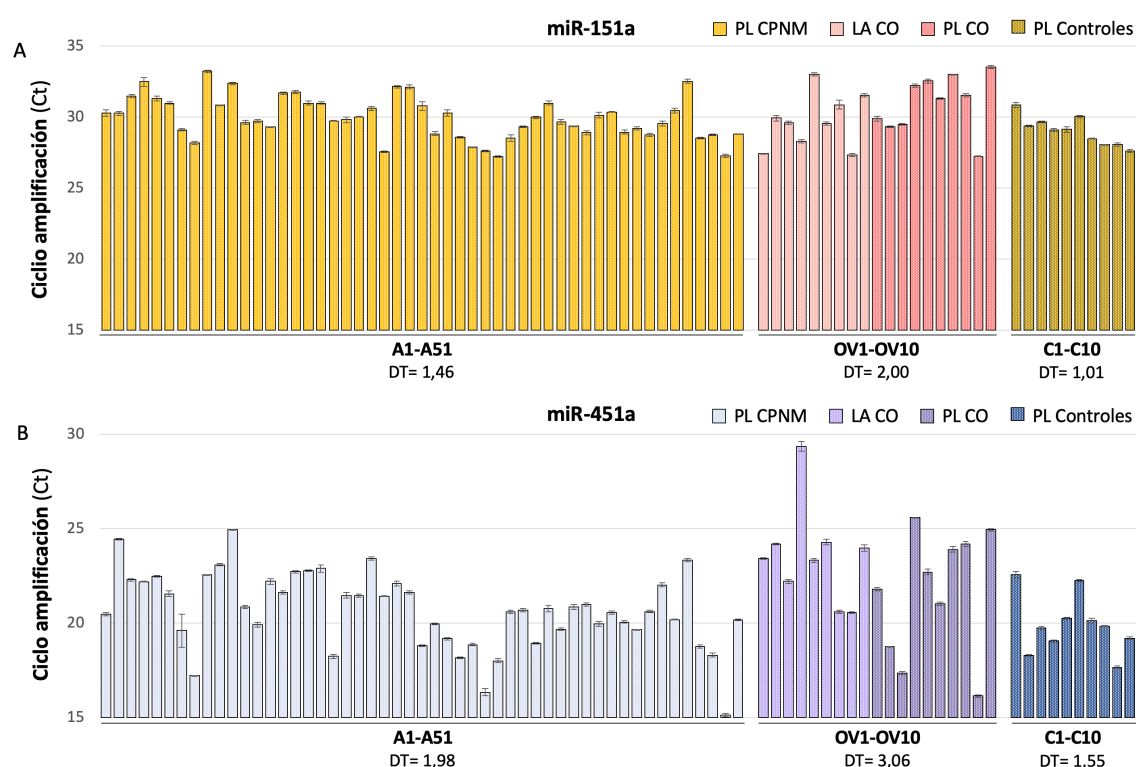


Figura 32. Ciclos de amplificación del miARN endógeno exosomal en muestras de pacientes. Cuantificación del miR-151a (**A**) y miR-451a (**B**) por qRT-PCR con sondas TaqMan™ (**Tabla 6**) en los exosomas aislados de plasma (PL) procedente de una cohorte de 51 pacientes de CPNM (A1-A51), 10 voluntarios sanos (C1-C10) y en exosomas extraídos de muestras pareadas de líquido ascítico (LA) y plasma (PL) de una cohorte de 10 pacientes de cáncer de ovario (CO; OV1-OV10).

Los resultados derivados de la validación de los miARNs endógenos exosomales en las muestras de pacientes confirmaron la selección del miR-151a como mejor endógeno para normalizar los niveles de los miARNs candidatos de nuestro trabajo y poder estudiar su implicación clínica en la cohorte de pacientes con CPNM.

4.3 Relevancia clínica de los miARNs candidatos en CPNM

Las guías de práctica clínica de ASCO (del inglés, American Society of Clinical Oncology) y ESMO (del inglés, European Society of Medical Oncology) recomiendan evaluar el beneficio clínico del tratamiento con quimioterapia a través de la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad/progresión^{5,29}. Para evaluar la relevancia clínica de los miARNs candidatos identificados en nuestro modelo experimental, analizamos los niveles exosomales de los miARN validados en la línea celular de cáncer de pulmón H23 (miR-142-3p, miR-451a y miR-55745) en las muestras procedentes de la cohorte prospectiva de 51 pacientes de CPNM y en 10 muestras de voluntarios sanos, normalizando la carga con el endógeno miR-151a. En la **Tabla 12**, se indican los niveles individuales normalizados de cada miARN para cada paciente y en el **Anexo 4** los de los controles sanos. La relevancia clínica del miR-891a-5p, cuya validación se observó específicamente en las líneas celulares de ovario, se evaluará en futuros estudios del laboratorio cuando se disponga de una cohorte más extensa de muestras de pacientes con este tipo tumoral. En primer lugar, evaluamos si existía disparidad en los niveles de los tres miARNs entre los pacientes y los controles y observamos diferencias significativas únicamente en el caso del miR-55745, pero no en los miR-142-3p y 451a (**Figura 33 A, B y C**).

A continuación, comprobamos si dentro de la cohorte de pacientes podía haber distintos grupos en función de los niveles de cada miARN y los dividimos en niveles “bajos” y “altos” en cada caso. Para establecer el punto de corte que segregase a los pacientes de la manera más eficiente, segmentamos los datos en los diferentes cuartiles y seleccionamos el percentil 75 en para el miR-142-3p y miR-452a (21,35 y 1258,07 respectivamente) y el percentil 25 para el miR-55745 (2,69). Tras un análisis de las diferencias entre los controles sanos y los dos grupos de pacientes con niveles “bajos” y “altos”, observamos diferencias significativas entre los tres grupos en el caso del miR-142-3p (**Figura 33D**) y entre el grupo de niveles altos con respecto a los otros dos en el caso del miR-451a (**Figura 33E**) y el miR-55745 (**Figura 33F**).

Posteriormente, para estudiar si existía una relación estadísticamente significativa entre los grupos segregados de pacientes con CPNM y el pronóstico en respuesta al tratamiento con platinos, realizamos un análisis de supervivencia mediante curvas Kaplan-Meier, evaluando los parámetros de supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG). Los resultados indicaron que pacientes con niveles altos del miR-142-3p en el contenido exosomal plasmático se relacionan significativamente con una peor supervivencia libre de progresión ($p=0,053$) y una menor supervivencia global ($p=0,023$) tras el tratamiento con platino con respecto a los que presentan niveles bajos de dicho miARN (**Figura 34A**). Del mismo modo, los pacientes con niveles

RESULTADOS

más elevados del miR-451a exosomal presentan un peor pronóstico en términos de SLP ($p=0,001$) y SG ($p=0,005$) en comparación con aquellos cuyos niveles eran bajos (**Figura 34B**). En el caso del miR-55745, no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes (**Figura 34C**). Por último, con la finalidad de investigar si existía sinergia en aquellos pacientes que presentaban ambos miRNAs sobre-representados (miR-142-3p y miR-451a) en el componente exosomal, que permitiese una mejor predicción de respuesta al tratamiento con platinos, analizamos, mediante una regresión de COX, la SLP y la SG en tres grupos: (1) pacientes con niveles altos de ambos miARNs, (2) pacientes con niveles bajos de ambos miARNs y (3) pacientes con uno de los dos miARN alto. Observamos que el riesgo de recaída aumentaba más de 9 veces en los pacientes con niveles altos de ambos miARNs y más de 10 veces el riesgo de *exitus* (**Figura 35**) frente a los que presentaban sólo uno de los dos miARNs aumentado.

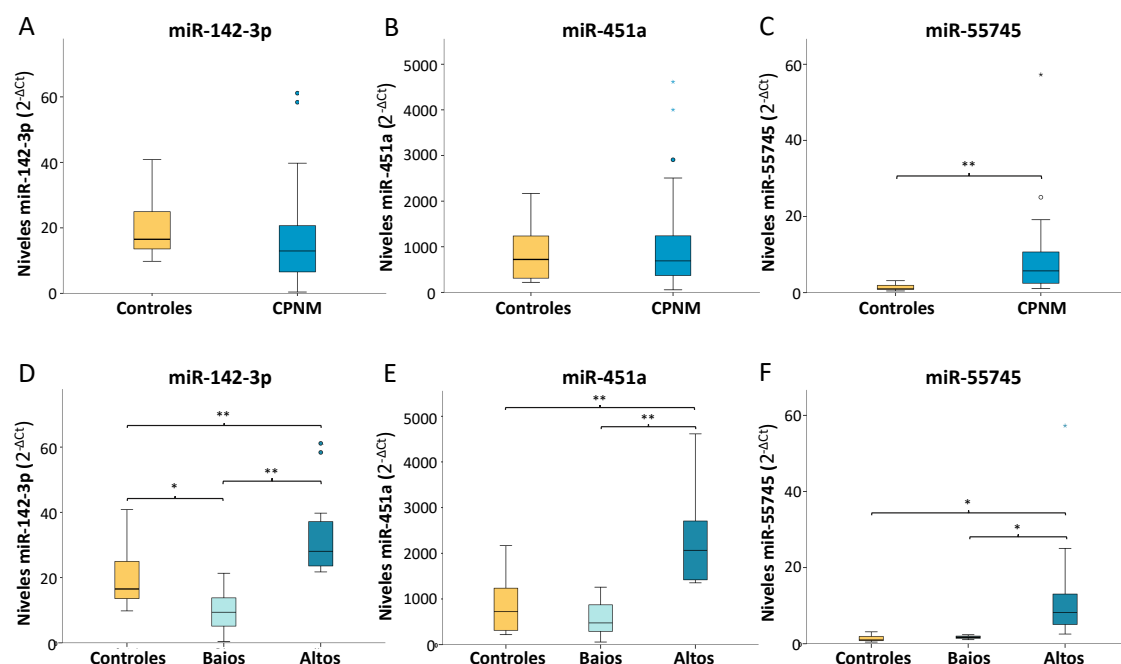


Figura 33. Comparación de los niveles de los miARNs con los controles sanos. Gráfico de cajas y bigotes que muestra la mediana, desviación estándar, valores máximos y mínimos, de los niveles exosomales del miR-142-3p (**A**), miR-451a (**B**) y miR-novel-55745 (**C**) entre los grupos: controles sanos (N=10) y pacientes con CPNM (N=51) y del miR-142-3p (**D**), miR-451a (**E**) y miR-novel-55745 (**F**) entre los grupos: controles sanos (N=10), y pacientes con CPNM segregados en niveles “bajos” y “altos” según el percentil 25 (miR-55745) o 75 (miR-142-3p y miR-451a). **= $p<0,001$; *= $p<0,01$ Prueba t de Student o ANOVA.

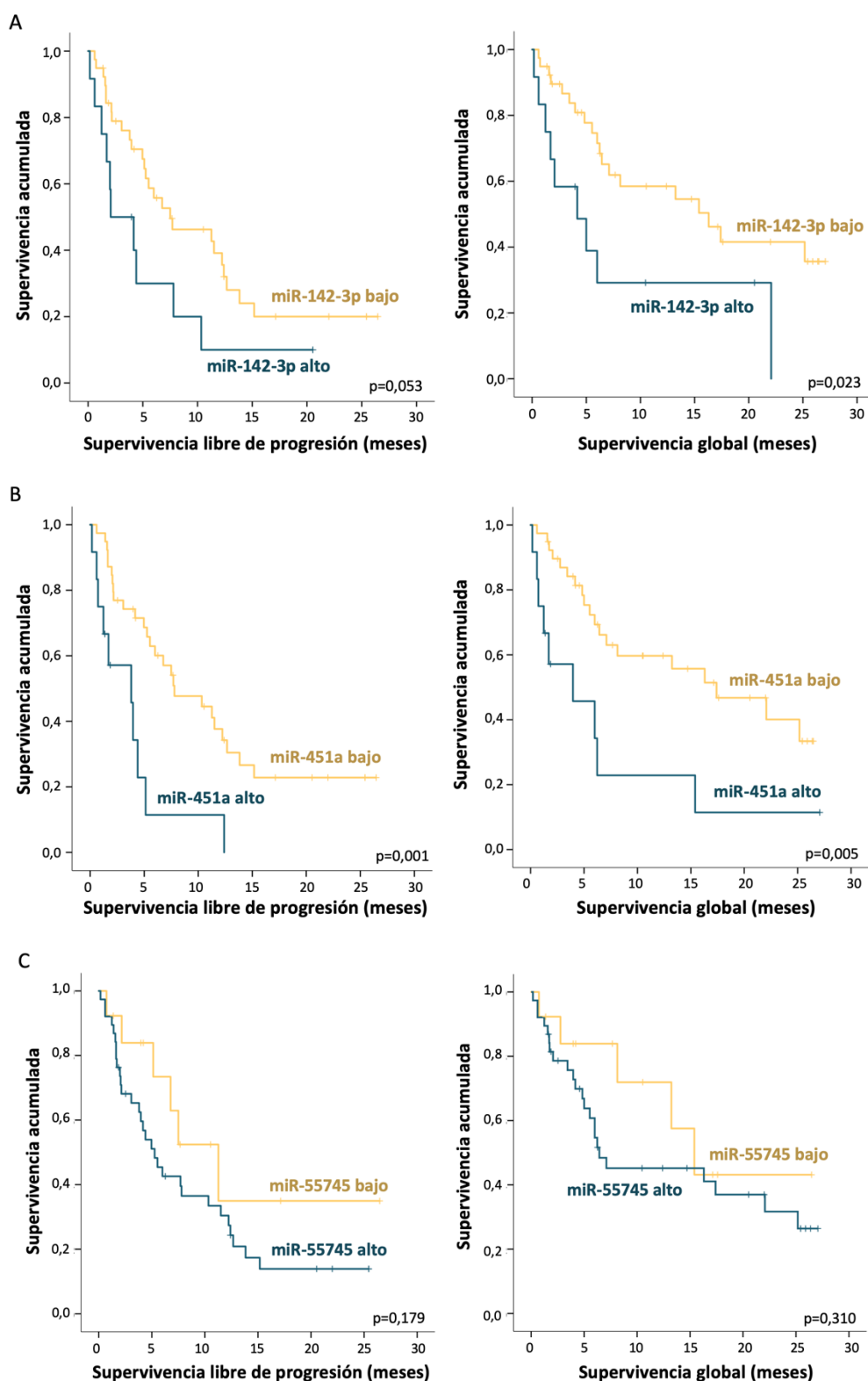


Figura 34. Análisis de supervivencia según los niveles de cada miARN candidato. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión (izquierda) y supervivencia global (derecha) en la cohorte prospectiva de 51 pacientes de CPNM separados por tener niveles altos o bajos según el percentil 75 del miR-142-3p (**A**), miR-451a (**B**) y según el percentil 25 del miR-55745 (**C**) en los exosomas circulantes de plasma.

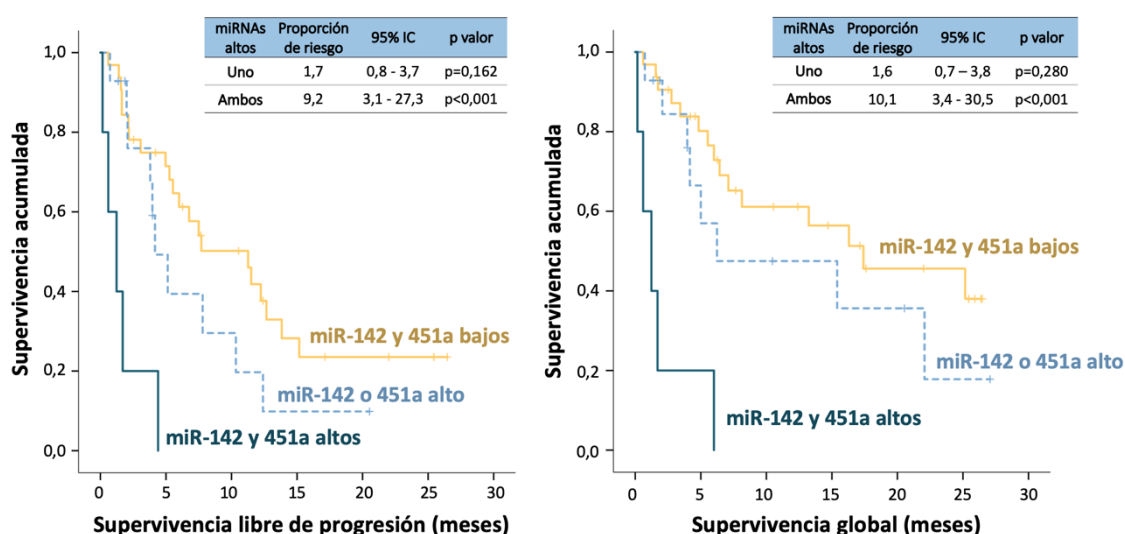


Figura 35. Análisis de supervivencia según los niveles de miR-142-3p y 451a. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión (izquierda) y supervivencia global (derecha) en la cohorte prospectiva de 51 pacientes de CPNM separados por tener conjuntamente niveles altos o bajos, según el percentil 75, de miR-142-3p y miR-451a en los exosomas circulantes de plasma.

Adicionalmente, para profundizar en el papel biológico de los miARNs 142-3p y 451a y su posible relación con las proteínas que habíamos identificado como sobre-representadas en el compartimento exosomal, realizamos una búsqueda de los genes diana que potencialmente podrían estar bajo su regulación a través del análisis en 12 algoritmos predictores (MicroT4, miRanda, mirbridge, miRDB, miRMap, miRNAmap, Pictar2, PITA, RNA22, RNAhybrid, miRWalk y Targetscan). Para el miR-142-3p se identificaron 989 genes y 147 en el caso del miR-451a, 20 de los cuales fueron comunes a ambos miARNs (**Anexo 5**). Además, un análisis ontológico de cada grupo de genes reveló que los procesos biológicos más destacados en ambos casos se relacionan con la regulación de la transcripción y la proliferación celular, además de la regulación de la apoptosis y ciclo celular específicamente en el caso de los genes diana del miR-451a (**Anexos 6 y 7**).

4.4 Validación traslacional y relevancia clínica de las proteínas candidatas

Para valorar la posible implicación clínica de las proteínas identificadas mediante proteómica *shotgun* en nuestro modelo experimental, extrajimos los exosomas del plasma de aquellos pacientes con muestra suficiente (45 de 51) de la cohorte de pacientes con CPNM avanzado mediante cromatografía de exclusión de tamaño. Una vez obtenidos los exosomas y validado su correcto aislamiento, extrajimos el contenido proteico y realizamos un análisis con proteómica dirigida en formato MRM de 20 de las 22 proteínas seleccionadas en las líneas celulares. Las proteínas ACTBL y TBB6 se excluyeron del estudio ya que pertenecen a familias de proteínas muy numerosas y homólogas entre sí y, por tanto, tienen pocos péptidos únicos que permitan reconocerlas de manera específica e inequívoca.

El análisis MRM permitió cuantificar 10 de las 20 proteínas monitorizadas dentro de los exosomas circulantes de los pacientes: A2M, ITIH1, ITIH2, APOE, TNC, LOXL2, HBA, GSN, TSP1 y FBN2 (**Tabla 12**). De la misma manera que con los miARNs, los análisis de supervivencia mediante curvas Kaplan-Meier se hicieron comparando dos grupos: pacientes con “niveles altos” o “niveles bajos” de cada una de las proteínas. En este caso el corte se situó en la media de los niveles de cada proteína en la cohorte. Observamos la existencia de una relación estadísticamente significativa entre niveles exosomales elevados de la proteína ITIH1 y un peor pronóstico en términos de PFS ($p=0,020$) y SG ($p=0,012$) (**Figura 36A**). De la misma manera, niveles altos de FBN2 influyeron en una peor SLP ($p=0,013$) y SG ($p=0,001$) (**Figura 36B**). Además, observamos que las proteínas LOXL2 y gelsolina presentaban el mismo patrón de distribución en los pacientes y que aquellos con niveles altos de estas dos proteínas presentaban menor supervivencia libre de progresión ($p=0,002$) y supervivencia global ($p=0,001$) (**Figura 36C**). No se observaron diferencias significativas en términos de SLP o de SG con el resto de las proteínas: TSP1, APOE, TNC, HBA, ITIH2 y A2M (**Anexo 8**).

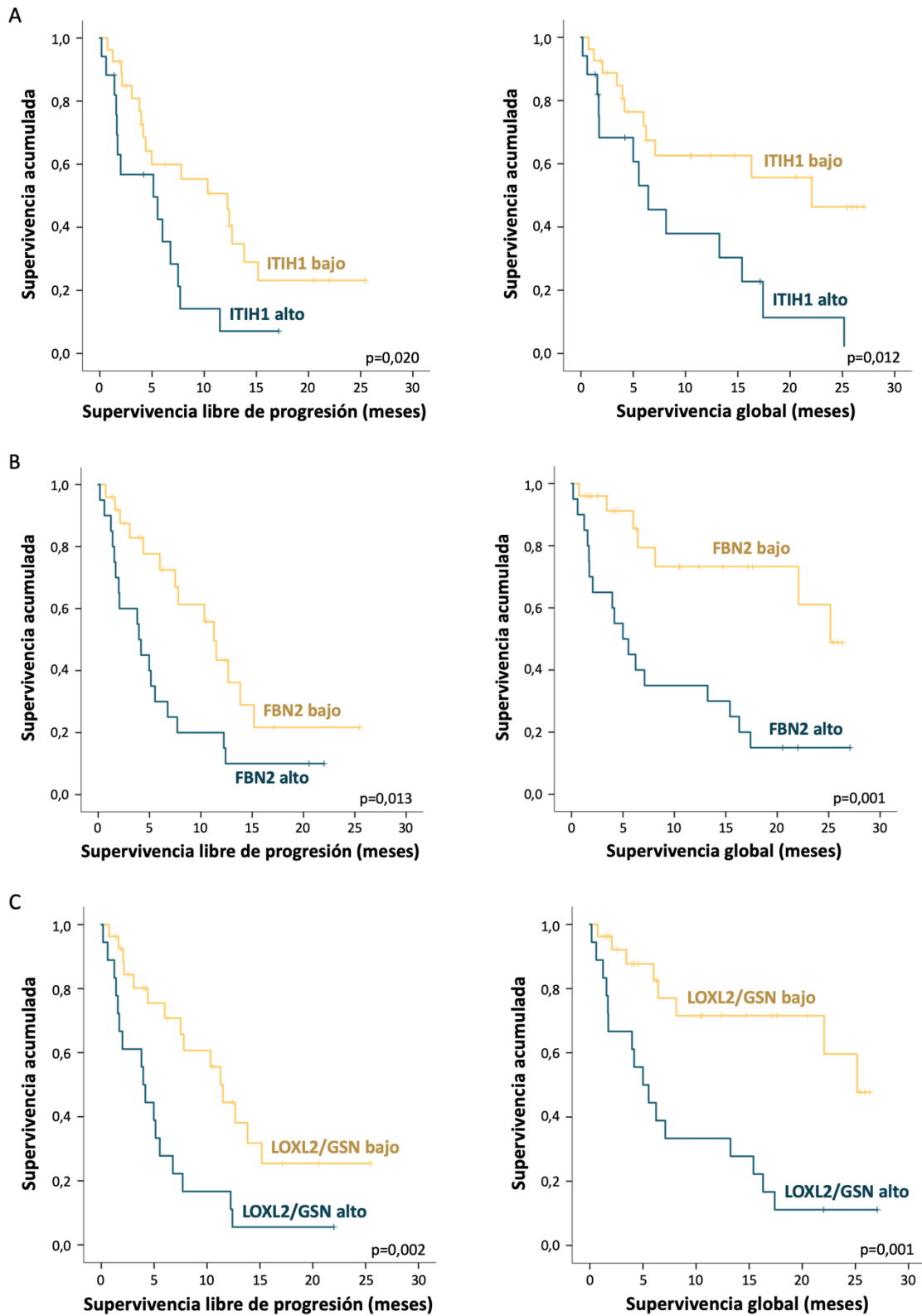


Figura 36. Análisis de supervivencia según los niveles de cada proteína candidata. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión (izquierda) y supervivencia global (derecha) en la cohorte de 45 pacientes de CPNM separados por tener niveles altos o bajos de la proteína ITIH1 (A), FBN2 (B) y LOXL2/GSN (C) en los exosomas circulantes de plasma.

4.5 Análisis integrado de los biomarcadores exosomales y su valor como panel predictivo de respuesta a platino en CPNM

El estudio individual de los 3 miARNs y las 10 proteínas candidatas realizado en muestras de pacientes recogidas en un estudio prospectivo con seguimiento clínico, permitió observar diferente grado de implicación entre cada candidato y la respuesta terapéutica observada en el conjunto de los pacientes. Por ello, decidimos integrar todos los candidatos en un mismo modelo de riesgo proporcional de Cox, que permitiera analizar el riesgo de *exitus* asociado a la abundancia de cada uno de los predictores estudiados. Este estudio se realizó en colaboración con el departamento de estadística del servicio de proteómica del CNB.

En primer lugar, para mitigar posibles desajustes del modelo debidos a la multicolinealidad de los datos, se aplicó un filtro de correlación que permitió reducir el panel original de 13 candidatos a 10. Los candidatos eliminados fueron FBN2 y LOXL2, muy fuertemente correlacionadas con GSN e ITIH1, muy correlacionada con ITIH2 (**Figura 37**).

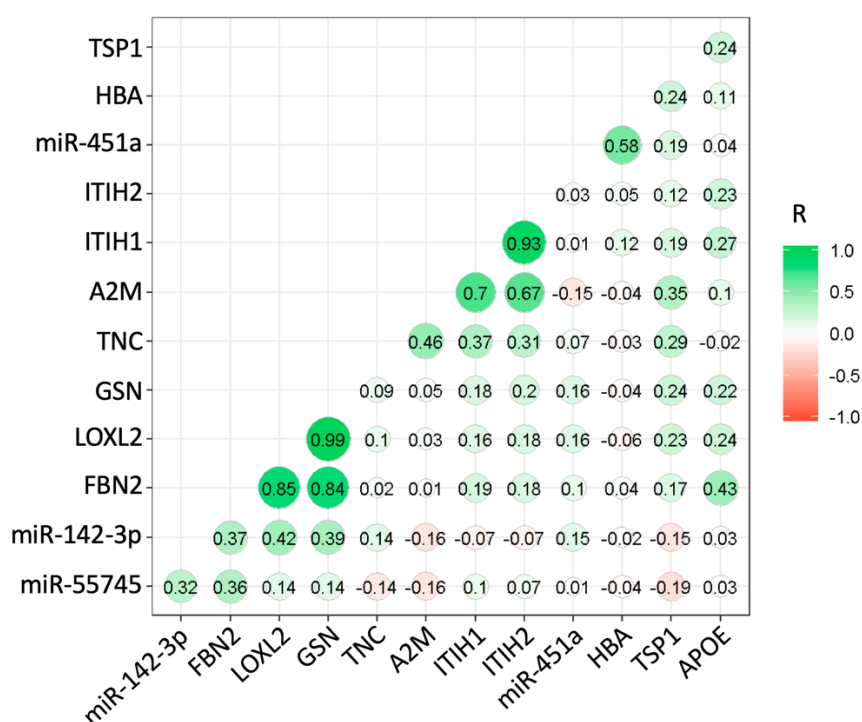


Figura 37. Análisis de correlación entre los miARNs y proteínas candidatas.

A continuación, se realizó una transformación BoxCox de los datos para eliminar las diferencias entre las escalas de medición de los distintos biomarcadores y, con el fin de continuar eliminando candidatos poco informativos, se utilizó un método de regresión penalizada (lasso). Los resultados del análisis permitieron prescindir del miR-55745, A2M, APOE y TNC. Posteriormente, se reajustó el modelo de Cox con los seis candidatos restantes y se fueron

eliminando secuencialmente los menos significativos, obteniendo un modelo final con tres biomarcadores, miR-142-3p, GSN e ITIH2, que presentaron coeficientes de riesgo del orden de 2 veces de manera estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (**Tabla 14**).

Tabla 14. Análisis de riesgo proporcional de Cox de SG con biomarcadores exosomales

Biomarcador	Coeficiente de riesgo	p valor
miR-142-3p	2,099	0,016
GSN	1,837	0,046
ITIH2	1,767	0,032

Paralelamente, se evaluó el impacto en la supervivencia de algunas variables clínicas como el estadio, el tipo histológico, el esquema de quimioterapia y el sexo, en la supervivencia global con el mismo tipo de análisis de riesgo proporcional de Cox. Los estadios IIIA, IIIB y IIIC se condensaron en un único grupo “III” y los tipos histológicos distintos a adenocarcinoma y o carcinoma epidermoide, se recodificaron en un único nivel “otros” y engloba no determinados, carcinomas de célula grande e indiferenciados. Por último, los tratamientos de quimioterapia se recodificaron en dos grupos atendiendo al tipo de platino utilizado. La condición basal sobre la que se realizaron las comparaciones fue mujer con carcinoma epidermoide en estadio III tratada con carboplatino. El riesgo de *exitus* disminuyó más de 5 veces en los pacientes con adenocarcinoma en comparación con el carcinoma epidermoide, sin embargo, no se observaron diferencias en los pacientes con tipo histológico codificado como “otros”. Además, el estadio IV destacó como un factor de riesgo considerable del orden de 4 veces mayor que el estadio III. Puesto que no se encontraron diferencias de supervivencia en función del sexo o del tipo de platino utilizado, estas variables se eliminaron secuencialmente del modelo (**Tabla 15**).

Tabla 15. Análisis de riesgo proporcional de Cox de SG con parámetros clínicos

Parámetro evaluado	Coeficiente de riesgo	p valor
Sexo Masculino	1,129	0,799
Tipo Histológico Adenocarcinoma	0,176	0,003
Tipo Histológico Otros	0,605	0,515
Estadio IV	4,062	0,016
QT Cisplatino	0,870	0,775

Por último, combinamos el modelo de biomarcadores exosomales con el de parámetros clínicos para comprobar si los tres biomarcadores seleccionados podían aportar información clínicamente relevante adicional a las características clínicas reportadas en la literatura. Para ello, se incorporó cada biomarcador por separado en el modelo de parámetros clínicos. En los tres casos, se detectó un incremento del riesgo estadísticamente significativo asociado a cada biomarcador independientemente del resto de los parámetros clínicos ($p < 0,05$). Además, cuando se evaluó la posible interacción con cada uno de los parámetros clínicos de manera independiente, se observó un incremento del riesgo asociado a los niveles de GSN específicamente en adenocarcinomas del orden de 3 veces sin alcanzar significación estadística ($p = 0,10$), un incremento significativo en más de 52 veces del riesgo asociado específicamente a pacientes con tipo histológico “otros” que presentan niveles elevados de miR-142-3p ($p < 0,05$) y en el caso de ITIH2, se detectó una interacción altamente significativa con el sexo, siendo un factor de riesgo específico de hombres del orden de 3,6 veces ($p = 0,014$) (**Anexo 9**).

En la **Tabla 16** se muestran los resultados del análisis final conjunto de los biomarcadores exosomales y clínicos y sus interacciones. Los niveles exosomales elevados del miR-142-3p supondrían un factor de riesgo estadísticamente significativo ($p < 0,039$; riesgo 2,3 veces), que se acentúa en el tipo histológico “otros”, (riesgo 34,94 veces) cercana a la significación estadística que no se alcanza por el reducido número de pacientes incluidos en dicho grupo ($p = 0,069$). Por otro lado, se observó un incremento del riesgo asociado a GSN en adenocarcinomas ($p = 0,002$; riesgo 17,95 veces) y asociado a ITIH2 en hombres ($p < 0,001$; riesgo de 23,154 veces).

Tabla 16. Análisis de riesgo proporcional de Cox de SG con parámetros clínicos y biomarcadores exosomales

Parámetro evaluado	Coefficiente de riesgo	p valor
Tipo Histológico Adenocarcinoma	0,004	<0,001
Tipo Histológico Otros	0,476	0,385
Estadio IV	13,475	0,007
miR-142-3p	2,300	0,039
GSN	0,734	0,026
ITIH2	0,237	0,062
Otros + miR-142-3p	34,943	0,069
Adenocarcinoma + GSN	17,952	0,002
Hombre + ITIH2	23,154	<0,001

Adicionalmente, se aplicó el mismo procedimiento utilizando la supervivencia libre de progresión en lugar de la supervivencia global. Sin embargo, este análisis conjunto no permitió obtener resultados de interés, ya que, aunque también se observó un aumento del riesgo asociado a los niveles de ITIH2 en 1,77 veces, no se alcanzó la significación estadística ($p=0,176$).

Discusión

DISCUSIÓN

1. IMPORTANCIA DE LA VISUALIZACIÓN 3D DE ESTRUCTURAS BIOLÓGICAS PARA UNA MAYOR COMPRENSIÓN DE SU COMPLEJIDAD Y FUNCIÓN

Las nuevas tecnologías de análisis masivo han permitido el acceso a una enorme cantidad de datos: la genómica, la transcriptómica y la proteómica proporcionan un conocimiento preciso de los componentes moleculares de los sistemas estudiados. Además, la biología estructural permite determinar la forma, función y ensamblaje de dichas moléculas y, por último, las técnicas de microscopía electrónica consiguen visualizar de manera muy detallada los sistemas biológicos. Cuando se combinan todas esas metodologías con avanzados programas informáticos de imagen, es posible generar y visualizar modelos moleculares de células y otros organismos^{189,190}. Especialmente en biología molecular, dada la complejidad de los procesos biológicos, las representaciones visuales proporcionan una perspectiva global de la información que permite su procesamiento de manera integrada, facilitando la comprensión y el aprendizaje, así como el desarrollo de hipótesis o teorías. Por ello, la ilustración científica constituye una potente herramienta para la difusión, divulgación y educación de los diferentes procesos biológicos¹⁹¹, así como en investigación^{190,192}. En este trabajo hemos querido integrar la mayor cantidad posible de datos disponibles sobre la composición molecular y estructural de los exosomas, así como la concentración relativa de cada uno de ellos con el fin de generar, por primera vez, un modelo robusto y preciso de estas nanovesículas en el contexto de la circulación sanguínea.

Además, hemos explorado y contrastado diferentes modos de crear visualizaciones. Por un lado, el enfoque del modelado 3D permite explorar hipótesis específicas sobre la relación de la estructura con la función, mientras que el enfoque ilustrativo tiene una mayor utilidad en educación y divulgación, por permitir una mayor licencia artística, con el objetivo de crear una representación visual más intuitiva y comprensible para una amplia audiencia. En este sentido, el diálogo entre ciencia y arte que se plantea, facilita la interpretación y desarrollo del modelo visual. Por un lado, el enfoque artístico proporciona una mayor libertad para dibujar aproximaciones y definir áreas que necesitan mayor exploración antes de pasar al modelo riguroso y preciso en 3D^{186,193}. Además, en entornos de divulgación y educación, las ilustraciones generalmente son mucho más comprensibles que las visualizaciones digitales de los modelos, debido al uso de la licencia artística para mejorar tanto el reconocimiento de componentes individuales como sus relaciones espaciales¹⁹¹. Por otro lado, los modelos 3D aportan un mayor rigor científico y permiten aumentar la complejidad a medida que se profundiza en el contexto específico de cada investigación¹⁹⁴.

A pesar de esto y aunque se han realizado representaciones visuales de exosomas, no se había desarrollado hasta la fecha un modelo preciso en escala y concentración de sus componentes^{195,196}. Por ello, el modelo presentado en este trabajo constituye la primera aproximación visual de un exosoma basada en la bibliografía existente, así como la primera estimación cuantitativa de los componentes exosomales que puede servir como base para el desarrollo de futuros estudios. La composición cualitativa y cuantitativa del contenido celular ha sido ampliamente estudiada y sirve como referencia para detectar anomalías y su relación con procesos patológicos^{138,197}. Sin embargo, aunque en los últimos años debido al auge en el estudio de las vesículas extracelulares, se han creado bases de datos que recogen información sobre su contenido^{85,198}, los datos disponibles sobre las concentraciones y enriquecimiento de los componentes son aún muy limitados, especialmente en cuanto a ácidos nucleicos. Este estudio pone de manifiesto la necesidad de una estandarización del contenido exosomal que permita su correcta cuantificación no solo en investigación centrada en modelos celulares, sino también como parámetro de uso clínico en biopsia líquida. Además, la visualización del modelo exosomal con una escala correcta permite una mejor percepción espacial para el desarrollo de terapias centradas en el uso de los exosomas como partículas vehiculares de fármacos o moléculas farmacoactivas.

Por último, esta parte del estudio ha concluido con la escritura de un manuscrito que ha sido enviado y se encuentra en proceso de publicación tras su aceptación el 30 de mayo del 2019.

2. IMPLICACIÓN DE LOS MIARNs Y PROTEINAS EXOSOMALES EN RESPUESTA A CISPLATINO EN CPNM

En los últimos años se han realizado grandes avances en la oncología de precisión, gracias a la caracterización molecular de los tumores y al estudio de sus interacciones con el microambiente tumoral a través del uso de tecnologías de análisis de alto rendimiento. En este sentido, los exosomas suponen una gran fuente de información sobre el tumor, ya que constituyen un mecanismo de comunicación celular que está especialmente potenciado en las células tumorales⁶⁷. Además, estas vesículas participan en los diferentes procesos de la carcinogénesis^{68,69}, por lo que su estudio permite ampliar el conocimiento global sobre los componentes moleculares implicados en el establecimiento y el desarrollo de la tumorogénesis, haciendo de ellos una prometedora fuente de biomarcadores.

En este estudio pretendemos contribuir a la comprensión de los mecanismos de resistencia a los derivados del platino en células tumorales de cáncer de pulmón y de ovario, así como a la identificación de nuevos biomarcadores en biopsia líquida en CPNM, a través del estudio del papel de los miARNs y las proteínas presentes en los exosomas circulantes del plasma sanguíneo en pacientes con dicha patología. Para ello, hemos utilizado una primera aproximación experimental con un modelo basado en cuatro parejas de líneas celulares, dos de cáncer de pulmón y dos de cáncer de ovario, sensibles y resistentes a cisplatino que presentan en todos los casos un índice de resistencia similar, por lo que podemos deducir que los mecanismos de resistencia son similares en todas ellas¹⁴². Este modelo nos ha permitido aislar y estudiar el compartimento exosomal presente en su secretoma, para identificar miARNs y proteínas con potencial papel como biomarcadores de resistencia a CDDP para su posterior validación traslacional en muestras de pacientes.

2.1 La sensibilidad celular a cisplatino se modifica tras la internalización de los exosomas procedentes de células resistentes

El campo de las vesículas extracelulares ha crecido significativamente en los últimos años y con él las diferentes metodologías de aislamiento de los exosomas, que incluyen ultracentrifugación, centrifugación por gradiente de densidad o separación por inmunoafinidad¹⁹⁹. Según la ISEV (del inglés, International Society of Extracellular Vesicles), no existe un único método de separación óptimo, sin embargo, es necesario caracterizar las muestras obtenidas con al menos dos técnicas diferentes y complementarias como la microscopía electrónica, el análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) o la detección de marcadores proteicos²⁰⁰. La caracterización, mediante dos metodologías, de las muestras extraídas en el presente estudio, confirma que se realizó un correcto aislamiento de los exosomas. La morfología y tamaño obtenidos a través de la microscopía electrónica de transmisión y NTA fueron similares a los estudios publicados previamente^{70,99,201–204}, en los que se observan tamaños de entre 30 y 150 nm de diámetro para este tipo de vesículas extracelulares. Adicionalmente, los análisis proteómicos realizados en nuestras muestras confirman la presencia de entre el 62 y el 78% de las proteínas más frecuentemente identificadas en exosomas, que se recogen en la base de datos ExoCarta⁸⁵, así como la ausencia de Calnexina, un marcador de retículo endoplasmático utilizado como control negativo en numerosas publicaciones^{205,206}.

Tras confirmar el correcto aislamiento de los exosomas, optimizamos el modelo experimental para nuestro estudio mediante la determinación de la resistencia a quimioterapia inducida por los exosomas procedente del secretoma de los diferentes modelos celulares generados en nuestro laboratorio. Desde el año 2012 diversos estudios han demostrado que los exosomas procedentes de células resistentes a diferentes fármacos antitumorales, contienen moléculas capaces de transmitir dicha resistencia a células adyacentes. La mayoría de ellos se han enfocado en el cáncer de mama y la resistencia a fármacos como Docetaxel o Tamoxifeno^{128,207–210}, aunque también se han publicado estudios en cáncer renal²¹¹, glioblastoma²¹², de ovario²¹³ o pulmón^{214,215}. Nuestros resultados demuestran, por primera vez, que los exosomas derivados de la línea celular de cáncer de pulmón H23R resistente a cisplatino, así como las líneas celulares de cáncer de ovario resistentes a dicho fármaco A2780R y 41MR, pueden transferir parte de su fenotipo resistente a células sensibles. Además, comprobamos que la internalización de los exosomas fue superior al 75% del cultivo tras 20 h de incubación, datos que concuerdan con el único estudio que evalúa la eficiencia de la internalización de los exosomas²¹⁶. Por el contrario, en la línea celular H460 no se modificó la sensibilidad al fármaco, lo que podría deberse a que, en ese caso, la internalización de los exosomas solo se produjo en el 50% de las células, que además presentaron una elevada mortalidad basal, pudiendo verse afectada su integridad celular, lo que podría haber comprometido la correcta captación posterior de exosomas. Por otro lado, podemos decir que la incubación de las células parentales con los exosomas de las células resistentes produce una mortalidad basal que varía entre el 20 y el 40% según la línea celular analizada. Según nuestro conocimiento, solo se ha publicado un estudio con diferentes dosis de vesículas extracelulares derivadas de células del epitelio ciliar no pigmentado, en el que reportan que no se produce mortalidad asociada en las células receptoras con ninguna de las dosis²¹⁷. En este estudio utilizan DiD (Sal 1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'- Tetrametil Indo Dicarboxianina, 4-Clorobenzenosulfonato) como marcaje, por lo que la mortalidad que nosotros encontramos podría estar asociada al PKH26.

Estos hallazgos, no solo nos permitieron elegir las líneas celulares H23, A2780 y 41M como el modelo más adecuado para continuar nuestro estudio, sino que confirman el papel inductor de resistencia de los exosomas, tal y como se ha reportado en estudios previos^{131,213}.

Por otra parte, valoramos el potencial de los exosomas procedentes de células sensibles a cisplatino como posible diana terapéutica de sensibilización al fármaco. Sin embargo, no observamos ningún cambio en la viabilidad de las células resistentes. Esto podría deberse a que, al haber estado expuestas a un agente externo muy agresivo como es la quimioterapia con dosis

crecientes, se hayan activado mecanismos de resistencia al fármaco independientes de las rutas activas en sus respectivas células parentales, lo que podría explicar la falta de efecto de las biomoléculas procedentes del contenido exosomal de éstas últimas. De hecho, los estudios que utilizan los exosomas como herramientas terapéuticas, se centran en su uso como vehículos para enviar fármacos o ARNs de interferencia a las células diana, inactivando nuevos procesos que se hayan establecido en la patología^{218,219}.

2.2 Significado clínico de los niveles exosomales del miR-142-3p y miR-451a como potenciales biomarcadores de respuesta a CDDP en CPNM

Tras seleccionar las líneas celulares pareadas H23, A2780 y 41M como modelo para continuar nuestro estudio, comparamos los niveles exosomales de miARNs entre los fenotipos sensible y resistente de cada pareja mediante el análisis por secuenciación masiva de miARNs (small RNA-seq), con el fin de identificar nuevos candidatos implicados en los mecanismos de resistencia a derivados del platino. El gran potencial de las técnicas de análisis de alto rendimiento está permitiendo un abordaje global del estudio de procesos biológicos complejos, ya que permiten analizar una gran cantidad de componentes al mismo tiempo e integrar información con datos proteicos o genómicos y establecer interacciones. Una de las ventajas que ofrece el small RNA-seq con respecto a otras técnicas de abordaje global como los microarrays, es que permite la identificación de miARNs nuevos (o noveles) no descritos ni registrados en las bases de datos. Por ese motivo, en los últimos años, ha aumentado de forma exponencial el número de miARNs recogidos en miRBase²²⁰. Sin embargo, es fundamental la correcta validación de los candidatos, ya que muchos de los miARNs inicialmente identificados resultaron ser falsos positivos^{221–223}. Actualmente, el uso de la secuenciación masiva del microRNoma en el contenido exosomal es todavía muy limitado, lo que otorga una gran novedad y fortaleza al presente trabajo, habiéndonos permitido identificar del orden de 300 miARNs noveles y 500-700 miARNs conocidos en cada pareja de líneas celulares. Esta estimación concuerda en orden de magnitud con los dos únicos estudios que reportan el número de miARNs identificados por NGS en el contenido exosomal^{224,225}. De los miARNs identificados, seleccionamos los ocho más ampliamente sobre-representados en el contenido exosomal procedente de células resistentes, cinco de ellos conocidos y tres noveles. Siguiendo los criterios descritos por miRBase, utilizamos la PCR cuantitativa como técnica alternativa para validar las diferencias de expresión identificadas por NGS y obtuvimos un porcentaje de coincidencia entre las dos técnicas del 50% aproximadamente, porcentaje de éxito que concuerda con los resultados obtenidos en un estudio previo realizado con exosomas de CPNM²¹⁵.

Se validaron en total cuatro miARNs, tres conocidos (miR-451a, miR-142-3p y miR-891a-5p) y uno novel (miR-55745). En algunos miARNs la amplificación obtenida por qRT-PCR fue muy baja o inexistente, como fue el caso del miR-novel-5149 en todas las líneas celulares o del miR-363-3p y miR-142-3p en 41M/MR. Esto podría deberse a que los niveles exosomales de estos candidatos fueran muy bajos, pero detectables en secuenciación masiva debido a la sensibilidad de la técnica, pero en este caso difícilmente amplificables por PCR. Además, en el caso del miARN novel-5149, podría deberse a que la sonda TaqMan personalizada tenga una menor especificidad de unión, ya que no ha seguido los pasos de control de calidad internos que desarrolla la casa comercial con las sondas estandarizadas antes de su puesta a la venta. En cualquier caso, nuestros hallazgos indican que, aunque la secuenciación masiva de miARNs es una herramienta muy valiosa para estudiar la implicación de un gran número de miARNs simultáneamente, continúa siendo fundamental la validación de los resultados por técnicas alternativas robustas como la qRT-PCR²²⁶. Adicionalmente analizamos los niveles de los miARNs validados en las líneas celulares resistentes a cisplatino, en dos líneas resistentes a carboplatino y encontramos que se validaron tres de los cuatro miARNs (75%), corroborando, además de la fortaleza de los candidatos identificados, que los mecanismos de resistencia a ambos fármacos son muy similares²²⁷, implicando en este proceso incluso a los componentes del contenido exosomal. Por tanto, podríamos estar identificando miARNs exosomales involucrados en la respuesta terapéutica a derivados del platino en general y no solo a cisplatino.

El miR-451a, cuya sobre-representación en los exosomas procedentes del fenotipo resistente a cisplatino se validó por qRT-PCR en las tres líneas celulares analizadas, se ha descrito ampliamente en la literatura como miARN supresor tumoral, en diversos tipos de cáncer^{228–230}. Sin embargo, en cuanto a su presencia y papel en exosomas, la información disponible es limitada, se ha reportado que se encuentra selectivamente enriquecido en vesículas extracelulares²³¹, relacionándose con tumorigénesis en adenocarcinoma pancreático y en CPNM^{232,233}, aunque los estudios realizados con muestras de pacientes son aún limitados. Su papel en estudios realizados en líneas celulares y muestras tumorales, que ha sido más ampliamente estudiado, reportando que en células de glioma el miR-451a inhibe el crecimiento a través de la regulación de la ruta PI3K/AKT vía *CAB39*²³⁴, gen que fue identificado en nuestro análisis de los potenciales genes diana del miR-451a. Además, se ha relacionado la regulación negativa de este miARN con resistencia a fármacos antitumorales en cáncer de mama^{235,236}, cáncer renal²³⁷ y CPNM^{238,239}. De hecho, en uno de los estudios realizado en cáncer de mama, observaron un incremento de la sensibilidad a doxorubicina tras la transfección de células MCF-7 con miR-451a²⁴⁰, lo que sería consistente con la tendencia observada en nuestras células de

fenotipo resistente, que aumentaron su sensibilidad a cisplatino tras ser transfectadas con este miARN. Por tanto, el hecho de que no encontrásemos expresión del miR-451a en el contenido celular de ninguna de las células analizadas, unido a su mencionado papel como miARN supresor tumoral, podría explicar que las células resistentes lo estuvieran expulsando vía exosomal como mecanismo de supervivencia, como se ha postulado previamente²⁴¹.

La sobre-representación del miR-142-3p en los exosomas de los subtipos celulares resistentes a cisplatino y a carboplatino específicamente en la línea celular de cáncer de pulmón H23, sugirieron que podría ser un mecanismo común de resistencia a los derivados del platino en este tipo tumoral. El papel de este miARN es controvertido, por una parte, se ha descrito en numerosos estudios como miARN supresor tumoral por su unión a oncogenes y por encontrarse fuertemente inhibido en varios tipos de cáncer²⁴²⁻²⁴⁵. También se ha relacionado su papel como supresor tumoral en el contexto de la quimioresistencia en leucemia mieloide aguda y CPNM a través de la regulación de *HMGB1*^{246,247}, gen implicado en múltiples procesos celulares tales como migración, proliferación o apoptosis, que fue identificado en nuestro análisis entre los potenciales genes diana del miR-142-3p. En cambio, otros estudios señalan su implicación en cáncer como miARN oncogénico en cáncer colorrectal²⁴⁸, carcinoma renal²⁴⁹ y en cáncer gástrico, en este último a través de la regulación del factor de transcripción FOXO4, gen implicado en apoptosis y ciclo celular²⁵⁰, que también identificamos como gen candidato diana del miR-142-3p. En el contexto exosomal, también se ha descrito su carácter dual como miARN supresor tumoral y oncomiR capaz de promover la carcinogénesis tanto en la célula que lo expulsa como en las células diana²⁴¹. En nuestros ensayos funcionales con mimics no observamos cambios en la viabilidad a cisplatino de las células sensibles (H23S) ni resistentes (H23R) transfectadas con el miR-142-3p en comparación con las transfectadas con el control negativo. No obstante, hallamos niveles intracelulares del miARN en ambos fenotipos, aunque más elevados en las resistentes. El papel dual de este miARN podría explicar la falta de respuesta observada en las líneas celulares por producirse una compensación entre sus acciones en los genes candidatos oncogénicos y supresores tumorales.

La sobre-representación del miR-891a-5p se observó en los exosomas procedentes de las dos líneas celulares de cáncer de ovario resistentes a CDDP y a CBDCA. Esto sugiere que el miR-891a-5p podría estar implicado en un mecanismo de resistencia específicamente en cáncer de ovario. Existen pocos estudios que describan su papel en cáncer aunque sus acciones parecen ser oncogénicas en cáncer de próstata²⁵¹, cáncer de pulmón²⁵² y osteosarcoma²⁵³. Su presencia en exosomas se ha descrito únicamente en un trabajo realizado en carcinoma nasofaríngeo en

el que se encuentra sobre-representado en los exosomas de células tumorales y del suero de pacientes con respecto a los exosomas control. En nuestro estudio la sobreexpresión del miR-891a-5p produce un aumento en la sensibilidad a cisplatino tanto en las células sensibles como en las células resistentes, lo que indica que podría tener también un papel como miARN supresor tumoral. En ese sentido, un estudio ha reportado que el miR-891a-5p se encuentra regulado negativamente en tumores embrionarios²⁵⁴. Nuestros resultados permiten hipotetizar que los niveles elevados del miR-891a-5p en exosomas circulantes en pacientes con cáncer de ovario, podrían ser un factor de buen pronóstico, hipótesis que tendríamos que confirmar en futuros estudios con las muestras que se está recogiendo en la actualidad en un ensayo prospectivo dirigido por nuestro grupo de investigación.

Los miARNs -142-3p, -451a y -55745, se validaron en una cohorte de 51 pacientes con CPNM en estadios avanzados que, pese a su extensión, está bien estandarizada ya que los porcentajes de los diferentes tipos histológicos, proporción hombre/mujer, tratamientos y datos de supervivencia asociados concuerdan con lo esperado en la clínica habitual⁹. Lamentablemente, la cohorte de muestras de cáncer de ovario no pudo utilizarse para analizar y evaluar la implicación clínica del miR-891a-5p por su reducido tamaño y a que el seguimiento clínico se encontraba en una fase muy temprana y por tanto no se disponía de datos de supervivencia en la mayoría de los casos en el momento de la realización de este trabajo. En el caso del miR-55745, observamos una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles exosomales detectados en el plasma de pacientes con CPNM y los encontrados en los voluntarios sanos. Además, los pacientes se segregaron significativamente en dos grupos “bajos” y “altos” según los niveles del miARN. Sin embargo, dichos grupos no mostraron diferencias en la supervivencia libre de enfermedad ni global. Esto concuerda con lo observado en los ensayos funcionales con mimics, en los que no hubo cambios en la viabilidad de las células al cisplatino tras la transfección. Por lo que podemos inferir que este miARN podría no estar implicado en el proceso de resistencia a cisplatino. Sin embargo, estos hallazgos ponen de manifiesto que el miR-novel-55745 sí que podría estar implicado en el establecimiento y desarrollo tumoral y por tanto podría tener un potencial uso clínico como biomarcador exosomal de diagnóstico de CPNM. Para determinar su implicación en el establecimiento temprano de la enfermedad, en estudios futuros del laboratorio se valorarán sus niveles exosomales en muestras de CPNM en estadios I y II en comparación con los donantes sanos.

No observamos diferencias significativas en los niveles exosomales de los miR-142-3p y miR-451a entre el plasma de pacientes con CPNM y el plasma de donantes sanos. Sin embargo,

la selección de los pacientes con niveles elevados, estadísticamente significativos, en ambos miARNs respecto a las muestras controles, permitió su asociación con un peor pronóstico en cuanto a supervivencia libre de progresión, lo que estaría relacionado con una peor respuesta al fármaco, influyendo también en una menor supervivencia global. Los niveles exosomales del miR-451a se han descrito previamente elevados en pacientes con CPNM en estadios tempranos no tratados con cisplatino, en comparación con los procedentes de donantes sanos. Esta diferencia respecto a nuestros resultados puede deberse al uso de un normalizador diferente, el miR-16, o al estadio de la enfermedad, sin embargo, también identifican una mejor supervivencia en los pacientes con menor abundancia de este miARN exosomal²³², apoyando los resultados que encontramos en pacientes con estadios avanzados y tratados con platino.

Asimismo, nuestra aproximación experimental pone de manifiesto que podría existir algún tipo de sinergia o interacción entre los miR-142-3p y -451a, compartiendo genes candidatos diana que actúen sobre las mismas rutas biológicas, ya que los pacientes con niveles altos de ambos miARNs exosomales mostraron nueve veces menor tiempo libre de progresión y diez veces menor supervivencia global. Los análisis ontológicos realizados con los genes diana de ambos miARNs revelaron su participación en procesos biológicos relacionados con proliferación celular y regulación de la apoptosis. Además, el hecho de que ambos miARNs tengan genes diana comunes, refleja que podrían compartir la regulación de oncogenes y/o genes supresores tumorales. De hecho, el factor de transcripción KLF13 y el gen supresor tumoral *TSC1*, genes candidatos diana de ambos miARNs, inhiben la proliferación celular en cáncer a través de la ruta de AKT. Por el contrario, hemos identificado protooncogenes diana comunes a ambos miARNs como *SLC7A11*²⁵⁷ o *EREG*, que estimula los receptores EGFR/ErbB activando múltiples vías de señalización que favorecen la progresión tumoral y la metástasis en CPNM²⁵⁸. La eliminación vía exosomal de ambos miRNAs podría estar contribuyendo a un balance entre ambas acciones, viéndose favorecidos mecanismos tan vinculados a la proliferación tumoral y resistencia a fármacos en CPNM como es la ruta EGFR/ErbB a través del aumento del gen *EREG*, que explicarían el carácter como miARNs supresores tumorales propuesto en el presente trabajo. Estos resultados podrían además sugerir el uso de tratamientos alternativos con inhibidores específicos de esta ruta para los pacientes con ambos miARNs elevados en el contenido exosomal y que no responden al tratamiento con platino en primera línea. Estos resultados indican que los niveles exosomales del miR-142-3p y del miR-451 podrían ser parámetros de uso clínico de manera individual o conjunta, como biomarcadores pronósticos y de respuesta a platino en biopsia líquida en pacientes con CPNM en estadios avanzados.

2.3 El miR-151a-3p como control endógeno para la normalización de la carga exosomal

En el estudio de los procesos biológicos, la relevancia de los resultados viene determinada por la comparación con un nivel de referencia establecido. Para poder diferenciar un proceso patológico de uno normal, definir si un biomarcador está sobreexpresado o inhibido, así como para muchas otras comparativas, es fundamental disponer de un parámetro estable que sirva de referencia. En el contexto celular, dichos parámetros de referencia están ampliamente estudiados y establecidos, siendo estos preferentemente componentes estructurales y esenciales para el mantenimiento celular como son las proteínas del citoesqueleto, los ARNs ribosómicos o el gen y proteína GAPDH^{259,260}. Sin embargo, existen áreas de conocimiento recientemente exploradas en las que aún no se han establecido dichas referencias, como es el caso de los exosomas. En este sentido, puesto que se ha demostrado que el contenido exosomal es selectivo con respecto al contenido celular²⁶¹, una elección incorrecta del control endógeno puede sesgar los resultados del estudio y llevar a conclusiones erróneas. En el contexto de los miARNs, los endógenos más frecuentemente utilizados para normalizar el contenido exosomal son el miR-16 y RNA nuclear pequeño (snRNA) U6 o RNU6B en cáncer²⁶²⁻²⁶⁹ y en otras patologías²⁷⁰⁻²⁷², a menudo sin validar su homogeneidad en estas nanovesículas. La utilización del miR-16 se justifica por su uso en estudios realizados en miARNs libres en plasma^{232,273} y con el RNU6B no se hace referencia al motivo de su elección como endógeno, probablemente suponiendo que su estabilidad en el contexto global de la célula puede extenderse a su uso en exosomas^{264,265}. No obstante, algunos estudios han demostrado la inadecuación de estos ARNs no codificantes como controles endógenos en los exosomas²⁷⁴⁻²⁷⁶. Este escenario descubre el riesgo de la falta de homogeneidad en prácticamente la totalidad de los resultados publicados hasta la fecha centrados en los niveles de miARNs exosomales. Asimismo, pone de manifiesto la enorme necesidad que existe de identificar un miARN con niveles exosomales estables que pueda servir como control endógeno para el análisis de los niveles de los miARNs de interés.

Por ese motivo, nos planteamos la identificación de un endógeno a partir de los datos del análisis microRNómico del contenido exosomal de nuestro modelo experimental con células sensibles y resistentes a CDDP y seleccionamos el miR-151a-3p, miR-22 y miR-221 por ser los tres candidatos con menor variabilidad entre las líneas celulares y que presentaron niveles elevados asociados con un número de lecturas altas por NGS en todas ellas, asegurándonos su detección mediante cualquier técnica de análisis alternativa. Además, los candidatos seleccionados presentaron una reducida variabilidad en el compartimento celular analizada en 30 tipos tumorales recogidos en la base de datos del TCGA, lo que refuerza su posible estabilidad en el contenido exosomal. Una primera validación por qRT-PCR de los tres miARNs y el miR-16 en

nuestro modelo de células sensibles y resistentes a CDDP junto con otras siete líneas celulares de distintos tipos tumorales, mostró que el candidato con menor variabilidad es el miR-151a. La fortaleza de este modelo reside en la utilización de células que han sufrido una agresión externa, como es la exposición continuada a cisplatino, que se ha visto que modifica la expresión génica y el perfil de metilación en las células²⁷⁷. Además, la estabilidad del miR-151a se mantuvo entre los distintos tipos tumorales, no sólo en las líneas de cáncer de pulmón y de ovario, confiriéndole validez para su uso en el contexto general de los exosomas en cáncer. Con la finalidad de comparar el valor como referente endógeno del miR-151a con el del miR-16, normalizamos los valores del miR-451a frente a ambos, observando que existía una correlación entre los datos al normalizar con ambos miARNs aunque el perfil de los niveles no era exactamente el mismo. Estas diferencias aumentaron al normalizar con ambos miARNs los niveles exosomales del miR-451a en el plasma de pacientes con CPNM, observándose que en un número mayor de muestras analizadas y de diferente origen, la menor variabilidad observada en los niveles del miR-151a, marcan una diferencia sustancial, ya que no se mantuvo la correlación previamente observada en las líneas celulares al normalizar frente al miR-16. Nuestros resultados ponen de manifiesto la importancia de utilizar un endógeno robusto cuya procedencia sea la del mismo compartimento celular que sobre el que se esté trabajando, sobre todo en muestras de pacientes, en las que la heterogeneidad es siempre superior a la observada en los modelos celulares. Su uso evitaría sesgos en la cuantificación que puedan conducir a conclusiones erróneas. Por último, confirmamos la validación traslacional del uso del miR-151a como endógeno exosomal en otras patologías y en muestras de exosomas procedentes de otros compartimentos biológicos al observar su alta homogeneidad en muestras pareadas de plasma y líquido ascítico de pacientes con cáncer de ovario y controles sanos. Dicha homogeneidad, como era de esperar, no se observó al analizar los niveles del miR-451a entre las diferentes condiciones analizadas.

La bibliografía existente acerca del miR-151a es limitada y controvertida, pero hasta la fecha no se ha descrito como potencial miRNA endógeno exosomal. Se ha reportado su implicación en cáncer de próstata como miARN supresor tumoral capaz de inhibir la proliferación y la migración en líneas celulares²⁷⁸, aunque también se encontró sobreexpresado en carcinoma esofágico con respecto a los controles normales²⁷⁹. La presencia del miR-151a en exosomas se ha descrito únicamente en un estudio realizado en glioblastoma, en el que relacionan niveles elevados con una mayor respuesta a temozolomida²⁸⁰. Sin embargo, nuestros hallazgos se apoyan no solo en la estabilidad que encontramos en la carga exosomal sino también en la estabilidad que presenta este miARN en 30 tipos tumorales del TCGA y en el hecho

de que en dos estudios centrados en la búsqueda de miRNAs normalizadores en distintos contextos; suero de pacientes con adenocarcinoma colorrectal y en frotis citológicos secos de lesiones tiroideas, identifican en sus barridos iniciales el miR-151a como uno de los candidatos con mayor estabilidad entre las muestras analizadas^{281,282}. Por lo tanto, nuestros hallazgos señalan al miR-151a como el mejor endógeno descrito hasta la fecha para la normalización de los niveles de los miARNs en el contenido exosomal en condiciones normales y tumorales, hallazgo que nos ha permitido presentar una patente a la Agencia Europea en abril de 2019 (Anexo 10).

2.4 Significado clínico de los niveles exosomales de las proteínas ITIH1, LOXL2, FBN2 y GSN como potenciales biomarcadores de respuesta a CDDP en CPNM

La proteómica basada en la espectrometría de masas constituye una herramienta de identificación rápida y robusta de péptidos y proteínas que no solamente permite la identificación de miles de proteínas en muestras biológicas complejas, sino también el desarrollo de técnicas cuantitativas a gran escala que permiten medir variaciones en su abundancia^{148,283}. Para la caracterización del contenido proteico exosomal en respuesta a platino, en una primera fase exploratoria, optamos por una estrategia de proteómica *shotgun*, que permite caracterizar el perfil proteico de una muestra biológica de la que no se tiene ningún conocimiento previo y cotejarla con una base de datos de referencia. El número total de proteínas únicas que identificamos (549 con al menos 2 péptidos), es comparable con los estudios proteómicos de exosomas publicados previamente^{284–287}. De las 549 proteínas, seleccionamos las 20 que presentaron mayor abundancia en los exosomas procedentes de los subtipos resistentes en comparación con sus parentales sensibles. Además, un análisis ontológico de los genes que codifican para cada una de ellas reveló su implicación en adhesión celular y organización de la MEC, procesos ampliamente relacionados con el desarrollo de metástasis y resistencia a fármacos^{288–291}, lo que podría explicar su presencia en exosomas circulantes en el plasma de pacientes en estadios avanzados, que presentan metástasis en todos los casos.

En una segunda fase de validación, utilizamos un método de proteómica dirigida MRM, que resulta idóneo para validar de forma rápida paneles de posibles biomarcadores proteicos en colecciones de muestras clínicas²⁹². Dicha aproximación nos permitió monitorizar con éxito las variaciones de abundancia de 10 de las 20 proteínas analizadas en los exosomas aislados del plasma de la cohorte de pacientes con CPNM (A2M, ITIH1, ITIH2, APOE, TNC, LOXL2, HBA, GSN, TSP1 y FBN2). Los modelos celulares constituyen una herramienta muy valiosa para el estudio

de biomarcadores a gran escala, sin embargo, las diferencias que presentan con respecto a las muestras clínicas hacen fundamental la validación de los datos obtenidos²⁹³. En este caso, dichas diferencias explicarían la detección de solo el 50% de las proteínas candidatas en las muestras de los pacientes. El análisis de supervivencia se realizó segregando a los pacientes en función de los valores de abundancia “bajos” y “altos” estimados con respecto a la media de cada proteína. Se identificó un mismo patrón de abundancia en las proteínas LOXL2 y GSN en los pacientes, siendo estadísticamente significativa la relación entre tener niveles elevados de las dos proteínas en el contenido exosomal y un peor pronóstico en términos de supervivencia libre de progresión y supervivencia global. La proteína lisil oxidasa homóloga 2 (LOXL2) desempeña un papel clave en la biogénesis de las matrices de tejido conectivo al catalizar la formación de enlaces cruzados en el colágeno y la elastina. Esta proteína se encuentra sobreexpresada en varios tipos de cáncer y se relaciona con mal pronóstico y metástasis^{294,295}, así como en la resistencia a fármacos antitumorales mediante la remodelación de la MEC^{290,296}. La gelsolina (GSN), que participa en la regulación del ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina, se ha visto desregulada en varios tipos tumorales. En cáncer gástrico y de vejiga se encuentra inhibido^{297,298}, mientras que su sobreexpresión se ha reportado en CPNM²⁹⁹ y en tumores uroteliales³⁰⁰. Ambas proteínas gelsolina y LOXL2 promueven la activación de la ruta de supervivencia de PI3K/AKT en células tumorales, ruta que además está implicada en la resistencia a cisplatino²⁷⁷. Por lo que la correlación observada entre los niveles elevados de estas proteínas y el peor pronóstico de los pacientes podría deberse a que una doble activación de la vía conllevaría una mayor agresividad tumoral y una mayor resistencia al tratamiento. La presencia de LOXL2 se ha descrito en exosomas³⁰¹, por lo que las células tumorales podrían estar utilizando los exosomas como mecanismo para modificar la MEC y permitir una mayor capacidad metastásica del tumor. En futuros ensayos sería de gran interés profundizar en el papel de estas proteínas en la progresión tumoral y respuesta a fármacos a través de ensayos funcionales.

Los niveles individuales elevados de ITIH1 y FBN2 en los exosomas de los pacientes también se relacionan con un peor pronóstico en términos de supervivencia libre de progresión y global. La proteína ITIH1 pertenece a la familia de inhibidores inter-alfa-tripsina, cuya pérdida de expresión es frecuente en múltiples tumores sólidos^{302,303}. La fibrilina 2 (FBN2) pertenece a una familia de glucoproteínas esenciales en la formación de fibras elásticas del tejido conectivo. Su papel en cáncer es aún poco conocido, aunque parece tener acciones como gen supresor tumoral (GST), habiéndose descrito la metilación aberrante de su región promotora en CPNM³⁰⁴, cáncer colorrectal³⁰⁵ y carcinoma escamoso esofágico³⁰⁶. El silenciamiento génico a través de la metilación del promotor es uno de los mecanismos epigenéticos reguladores de la expresión de

GSTs en carcinogénesis³⁰⁷. La expulsión de ITIH1 y FBN2 vía exosomas podría explicarse, de la misma forma que el miR-142-3p, como un mecanismo de protección celular frente al carácter supresor tumoral de dichas proteínas.

Estos resultados indican que los niveles exosomales de las proteínas LOXL2 o gelsolina, así como de ITIH1 y FBN2 podrían ser utilizados como biomarcadores de pronóstico y respuesta a platino en biopsia líquida en pacientes con CPNM en estadios avanzados.

2.5 Panel de biomarcadores exosomales de pronóstico en CPNM

Los miARNs y las proteínas son moléculas con capacidad biológica propia, cuya interacción se ha estudiado como firma molecular para el diagnóstico y tratamiento del cáncer³⁰⁸. El estudio conjunto de proteínas y miARNs biomarcadores dentro del contexto exosomal, permite eliminar la heterogeneidad tumoral que existe en las muestras de tejido, además, la biopsia líquida permite una mayor accesibilidad de la muestra. De nuestro estudio se deriva que la valoración individual de la abundancia de determinados miARNs y proteínas exosomales podría ser una herramienta con gran potencial para profundizar en el diagnóstico y la progresión de la enfermedad. El principal problema de esta aproximación es que la elección del percentil es arbitraria y no tiene porqué corresponder con una división natural entre subpoblaciones de pacientes con valores distintos para la abundancia media de un determinado biomarcador. Además, dificulta tener en cuenta el efecto combinado de varios biomarcadores y/o parámetros clínicos. En cambio, el uso de paneles de biomarcadores permite optimizar la combinación de la información proporcionada por múltiples moléculas para predecir el pronóstico de un paciente. Por este motivo, optamos por integrar los 10 candidatos proteicos y los 3 miARNs utilizando el modelo de riesgo proporcional de Cox. En este modelo, los coeficientes de riesgo indican el factor por el que se multiplica el riesgo al incrementarse en una unidad la abundancia de un determinado biomarcador.

La presencia de predictores altamente correlacionados suele ser una fuente de inestabilidad en métodos de análisis multivariante, dificultando la correcta evaluación de su significación. Por lo que redujimos el grupo GSN/FBN2/LOXL2 a GSN y el grupo ITIH1/ITIH2 a ITIH2. A continuación se eliminaron los biomarcadores menos informativos, quedando un modelo compuesto por miR-142-3p, gelsolina e ITIH2. Teniendo en cuenta que, por su elevada correlación, ITIH2 aporta la misma información que ITIH1, y GSN la misma que LOXL2 y FBN2, tres de los cuatro biomarcadores (miR-142-3p, miR-451a, GSN/LOXL2/FBN2 e ITIH1/ITIH2) identificados en los análisis individuales, se seleccionaron dentro del modelo de riesgo conjunto,

poniendo de manifiesto la solidez de dichos biomarcadores como predictores de pronóstico y respuesta al tratamiento en CPNM en estadios avanzados. El mayor peso predictivo del miR-142-3p en comparación con miR-451a en los pacientes podría deberse a que este miARN, que se validó tanto en las líneas resistentes a cisplatino como a carboplatino, podría tener un mayor papel en los mecanismos comunes de resistencia, ya que en nuestra cohorte los pacientes estaban tratados con ambos derivados del platino. No descartamos el hecho de que ambas biomoléculas (miARNs y proteínas) pudieran actuar conjuntamente en distintos niveles de una misma ruta biológica, de hecho, al menos 21 genes diana del miR-142-3p participan en la vía de señalización del calcio, catión que estimula la actividad de la gelsolina³⁰⁹, por lo que una disminución intracelular de este miARN podría estar potenciando la activación de gelsolina, y por tanto favoreciendo el proceso tumorigénico

La fiabilidad del modelo de biomarcadores se evaluó utilizando solamente variables clínicas como predictores, que confirman los datos descritos en la literatura en relación al menor riesgo asociado al tipo histológico adenocarcinoma³¹⁰ y un mayor riesgo asociado al estadio IV³¹¹. La construcción de un panel combinado de indicadores clínicos y biomarcadores, junto con sus interacciones permite la obtención de un modelo generalizable y con potencial uso en la práctica clínica habitual. En este modelo se acentuaron tanto las magnitudes de los factores de riesgo como la significación de los efectos ya descritos, lo que se debe a que el modelo contiene más parámetros de los que el tamaño de la cohorte puede soportar de forma estable. No obstante, no se observaron cambios en los coeficientes contradictorios con los modelos anteriores ni con los datos descritos en la literatura^{310,311}, por lo que seguiría suponiendo un modelo fiable mientras se tengan en cuenta la sobredimensión de los coeficientes de riesgo.

Los niveles exosomales del miR-142-3p constituyen un factor de riesgo en pacientes con CPNM adicional al estadio y al tipo histológico. Además, los niveles exosomales de la proteína ITIH2 supondrían un riesgo en hombres, mientras que los de gelsolina afectarían específicamente a los pacientes con adenocarcinoma. En futuros estudios sería de gran interés investigar la posible regulación hormonal de ITIH2 en CPNM, que pudiera explicar la relación entre los niveles de la proteína y el sexo del paciente, ya que se ha descrito una relación entre la expresión de este gen y los niveles de estrógenos en cáncer de mama³⁰². También sería interesante validar la relación entre el tipo histológico adenocarcinoma y los niveles de gelsolina en una cohorte de pacientes con CPNM más extensa, eliminando las posibles sobreestimaciones debidas al tamaño muestral, esto permitiría además obtener resultados de mayor interés en términos de supervivencia libre de progresión en el modelo de estimación de riesgo de Cox.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. Con este trabajo hemos generado el primer modelo visual en 3D de un exosoma circulante que muestra la complejidad de la composición exosomal. Este modelo facilita la comprensión espacial y estructural, así como la proporción existente entre las moléculas del contenido exosomal. Además, este modelo constituye la primera estimación cuantitativa de los componentes exosomales que sienta las bases para el desarrollo de futuros estudios.
2. El modelo experimental compuesto por las líneas celulares H23, A2780 y 41M constituye una aproximación válida para el desarrollo de este trabajo, ya que la internalización de los exosomas procedentes de células resistentes a cisplatino en al menos el 75% de las células sensibles produjo un descenso en la sensibilidad al fármaco.
3. La combinación del uso de técnicas de secuenciación masiva del microRNoma, algoritmos bioinformáticos dirigidos y posteriores estrategias de selección y validación, han permitido identificar 3 microARNs conocidos, -451a, -142-3p y -891a-5p, así como describir, por primera vez, el miR-novel-55745, no incluido en las bases de datos. Estos candidatos podrían estar implicados en la aparición de resistencia a derivados del platino en CPNM y cáncer de ovario.
4. La secreción de los miARNs 142-3p y 451a vía exosomal al exterior celular podría favorecer el desarrollo de mecanismos de resistencia al fármaco, generando fenotipos de mayor agresividad. De hecho, su análisis traslacional demuestra una correlación significativa y sinérgica entre niveles exosomales elevados y un pronóstico desfavorable en cuanto a supervivencia global y libre de progresión.
5. Por tanto, niveles exosomales del miR-142-3p y del miR-451 permitirían monitorizar el pronóstico y la respuesta a platino en biopsia líquida en pacientes con CPNM en estadios avanzados y facilitar la elección de terapias alternativas a dicho fármaco.
6. En este trabajo no se ha observado una asociación significativa entre los niveles exosomales del microARN novel 55745 y la progresión de la enfermedad, aunque podría estar implicado en el establecimiento del CPNM, ya que se encuentran diferencialmente elevados en pacientes con CPNM. Por tanto, la valoración de sus niveles exosomales en biopsia líquida podría ser de utilidad como biomarcador de diagnóstico precoz.

7. Los estudios de proteómica *shotgun* y proteómica dirigida, junto con un análisis traslacional en muestras de pacientes con CPNM en estadios avanzados nos ha permitido identificar las proteínas exosomales ITIH1, LOXL2/GELS y FBN2 como potenciales biomarcadores de pronóstico y respuesta al tratamiento con derivados del platino, correlacionándose niveles elevados con un peor pronóstico en términos de supervivencia global y libre de progresión.
8. En este trabajo hemos desarrollado un modelo de riesgo proporcional que en función de la abundancia de cada uno de los predictores estudiados (miARNs y proteínas) y los datos clínicos de los pacientes, permite analizar el riesgo de *exitus* asociado. Este modelo, predice un riesgo mayor vinculado con el miR-142-3p, que se incrementa con las proteínas gelsolina e ITIH2 en función del tipo histológico y el sexo del paciente.
9. Por último, con este trabajo hemos identificado, un miARN exosomal cuyos niveles no varían entre distintos tipos tumorales, muestras control, diferentes tratamientos farmacológicos ni entre muestras con diferentes orígenes. La homogeneidad en sus niveles, independientemente de la muestra analizada, hace del miR-151a el primer miARN endógeno de origen exosomal identificado con potencial normalizador y supone un gran hallazgo en el estudio de los miARNs exosomales.

Bibliografia

BIBLIOGRAFÍA

1. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
2. J, F. *et al.* *Cancer Today (powered by GLOBOCAN 2018)*. (<https://gco.iarc.fr/today>).
3. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
4. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
5. Planchard, D. *et al.* Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **29**, iv192–iv237 (2018).
6. Takiguchi, Y., Sekine, I., Iwasawa, S., Kurimoto, R. & Tatsumi, K. Chronic obstructive pulmonary disease as a risk factor for lung cancer. *World J. Clin. Oncol.* **5**, 660–666 (2014).
7. Ytterstad, E., Moe, P. C. & Hjalmsen, A. COPD in primary lung cancer patients: prevalence and mortality. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **11**, 625–636 (2016).
8. Hamilton, G. & Rath, B. Smoking, inflammation and small cell lung cancer: recent developments. *Wien. Med. Wochenschr.* **1946**, 379–386 (2015).
9. Herbst, R. S., Heymach, J. V. & Lippman, S. M. Lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1367–1380 (2008).
10. Travis, W. D. *et al.* The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* **10**, 1243–1260 (2015).
11. Detterbeck, F. C. The eighth edition TNM stage classification for lung cancer: What does it mean on main street? *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **155**, 356–359 (2018).
12. Postmus, P. E. *et al.* Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **28**, iv1–iv21 (2017).
13. Wolchok, J. D. *et al.* Guidelines for the Evaluation of Immune Therapy Activity in Solid Tumors: Immune-Related Response Criteria. *Clin. Cancer Res.* **15**, 7412–7420 (2009).
14. Snyder, A. *et al.* Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2189–2199 (2014).
15. Rizvi, N. A. *et al.* Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* **348**, 124–128 (2015).
16. Roberts, S. A. & Gordenin, D. A. Hypermutation in human cancer genomes: footprints and mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 786–800 (2014).
17. Hellmann, M. D. *et al.* Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden. *N. Engl. J. Med.* **378**, 2093–2104 (2018).
18. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2015. *SEER* Available at: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/index.html. (Accessed: 15th March 2019)
19. Reid, B. M., Permuth, J. B. & Sellers, T. A. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol. Med.* **14**, 9–32 (2017).
20. Sankaranarayanan, R. & Ferlay, J. Worldwide burden of gynaecological cancer: the size of the problem. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **20**, 207–225 (2006).
21. Prat, J. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* **460**, 237–249 (2012).
22. McCluggage, W. G. Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis. *Pathology (Phila.)* **43**, 420–432 (2011).
23. Veras, E. *et al.* Cystic and adenofibromatous clear cell carcinomas of the ovary: distinctive tumors that differ in their pathogenesis and behavior: a clinicopathologic analysis of 122 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* **33**, 844–853 (2009).
24. Seidman, J. D. & Khedmati, F. Exploring the histogenesis of ovarian mucinous and transitional cell (Brenner) neoplasms and their relationship with Walthard cell nests: a study of 120 tumors. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **132**, 1753–1760 (2008).
25. Singer, G. *et al.* Patterns of p53 Mutations Separate Ovarian Serous Borderline Tumors and Low- and High-grade Carcinomas

- and Provide Support for a New Model of Ovarian Carcinogenesis. *Am. J. Surg. Pathol.* **29**, 218–224 (2005).
26. Singer, G. *et al.* Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **95**, 484–486 (2003).
27. Wiegand, K. C. *et al.* ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *N. Engl. J. Med.* **363**, 1532–1543 (2010).
28. Ricci, F., Affatato, R., Carrassa, L. & Damia, G. Recent Insights into Mucinous Ovarian Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
29. Ledermann, J. A. *et al.* Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **29**, iv259–iv259 (2018).
30. Heintz, A. *et al.* Carcinoma of the Ovary. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **95**, S161–S192 (2006).
31. Voest, E. E., van Houwelingen, J. C. & Neijt, J. P. A meta-analysis of prognostic factors in advanced ovarian cancer with median survival and overall survival (measured with the log (relative risk)) as main objectives. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **25**, 711–720 (1989).
32. Pfisterer, J. & Ledermann, J. A. Management of platinum-sensitive recurrent ovarian cancer. *Semin. Oncol.* **33**, S12–16 (2006).
33. Burger, R. A. *et al.* Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2473–2483 (2011).
34. Konecny, G. E. & Kristeleit, R. S. PARP inhibitors for BRCA1/2-mutated and sporadic ovarian cancer: current practice and future directions. *Br. J. Cancer* **115**, 1157–1173 (2016).
35. Jordan, P. & Carmo-Fonseca, M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **57**, 1229–1235 (2000).
36. Siddik, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **22**, 7265–7279 (2003).
37. Timerbaev, A. R., Hartinger, C. G., Aleksenko, S. S. & Keppler, B. K. Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern analytical methodology. *Chem. Rev.* **106**, 2224–2248 (2006).
38. Köberle, B., Tomicic, M. T., Usanova, S. & Kaina, B. Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta* **1806**, 172–182 (2010).
39. Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* **31**, 1869–1883 (2012).
40. Kasahara, K. *et al.* Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer cell lines to cisplatin. *Cancer Res.* **51**, 3237–3242 (1991).
41. Holzer, A. K. & Howell, S. B. The internalization and degradation of human copper transporter 1 following cisplatin exposure. *Cancer Res.* **66**, 10944–10952 (2006).
42. Rabik, C. A. & Dolan, M. E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat. Rev.* **33**, 9–23 (2007).
43. Alberts, B. *et al.* General Principles of Cell Communication. *Mol. Biol. Cell 4th Ed.* (2002).
44. Deatherage, B. L. & Cookson, B. T. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect. Immun.* **80**, 1948–1957 (2012).
45. van Niel, G., D’Angelo, G. & Raposo, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 213–228 (2018).
46. Yáñez-Mó, M. *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles* **4**, 27066 (2015).
47. Raposo, G. & Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles and friends. *J. Cell Biol.* **200**, 373–383 (2013).
48. Pan, B. T. & Johnstone, R. M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* **33**, 967–978 (1983).
49. Harding, C., Heuser, J. & Stahl, P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* **97**, 329–339 (1983).
50. Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L. & Turbide, C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* **262**, 9412–9420 (1987).
51. Raposo, G. *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* **183**, 1161–1172 (1996).

52. Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 255–289 (2014).
53. Robbins, P. D. & Morelli, A. E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 195–208 (2014).
54. Greening, D. W., Gopal, S. K., Xu, R., Simpson, R. J. & Chen, W. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **40**, 72–81 (2015).
55. Heijnen, B. H. F. G., Schiel, A. E., Fijnheer, R., Geuze, H. J. & Sixma, J. J. Activated Platelets Release Two Types of Membrane Vesicles : microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood J.* **94**, 3791–3800 (1999).
56. Nair, R. *et al.* Extracellular vesicles derived from preosteoblasts influence embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells Dev.* **23**, 1625–1635 (2014).
57. Teng, X. *et al.* Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Improve the Microenvironment of Infarcted Myocardium Contributing to Angiogenesis and Anti-Inflammation. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **37**, 2415–2424 (2015).
58. Frühbeis, C. *et al.* Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS Biol.* **11**, e1001604 (2013).
59. Frühbeis, C., Fröhlich, D., Kuo, W. P. & Krämer-Albers, E.-M. Extracellular vesicles as mediators of neuron-glia communication. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, 182 (2013).
60. Greening, D. W., Nguyen, H. P. T., Elgass, K., Simpson, R. J. & Salamonsen, L. A. Human Endometrial Exosomes Contain Hormone-Specific Cargo Modulating Trophoblast Adhesive Capacity: Insights into Endometrial-Embryo Interactions. *Biol. Reprod.* **94**, 38 (2016).
61. Mitchell, M. D. *et al.* Placental exosomes in normal and complicated pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **213**, S173–181 (2015).
62. Wu, X., Zheng, T. & Zhang, B. Exosomes in Parkinson's Disease. *Neurosci. Bull.* **33**, 331–338 (2017).
63. Takahashi, R. H. *et al.* Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. *Am. J. Pathol.* **161**, 1869–1879 (2002).
64. Fevrier, B. *et al.* Cells release prions in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 9683–9688 (2004).
65. Amabile, N., Rautou, P.-E., Tedgui, A. & Boulanger, C. M. Microparticles: key protagonists in cardiovascular disorders. *Semin. Thromb. Hemost.* **36**, 907–916 (2010).
66. Ruivo, C. F., Adem, B., Silva, M. & Melo, S. A. The Biology of Cancer Exosomes: Insights and New Perspectives. *Cancer Res.* **77**, 6480–6488 (2017).
67. Szczepanski, M. J., Szajnik, M., Welsh, A., Whiteside, T. L. & Boyiadzis, M. Blast-derived microvesicles in sera from patients with acute myeloid leukemia suppress natural killer cell function via membrane-associated transforming growth factor- β 1. *Haematologica* **96**, 1302–1309 (2011).
68. Chalmin, F. *et al.* Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J. Clin. Invest.* **120**, 457–471 (2010).
69. Tadokoro, H., Umez, T., Ohyashiki, K., Hirano, T. & Ohyashiki, J. H. Exosomes derived from hypoxic leukemia cells enhance tube formation in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **288**, 34343–34351 (2013).
70. Peinado, H. *et al.* Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* **18**, 883–891 (2012).
71. Xu, R. *et al.* Extracellular vesicles in cancer — implications for future improvements in cancer care. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **15**, 617 (2018).
72. Simons, M. & Raposo, G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 575–581 (2009).
73. Loncle, N., Agromayor, M., Martin-Serrano, J. & Williams, D. W. An ESCRT module is required for neuron pruning. *Sci. Rep.* **5**, 8461 (2015).
74. Carlton, J. G. & Martin-Serrano, J. Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science* **316**, 1908–1912 (2007).
75. Morita, E. & Sundquist, W. I. Retrovirus

- budding. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 395–425 (2004).
76. Christ, L., Raiborg, C., Wenzel, E. M., Campsteijn, C. & Stenmark, H. Cellular Functions and Molecular Mechanisms of the ESCRT Membrane-Scission Machinery. *Trends Biochem. Sci.* **42**, 42–56 (2017).
77. Teis, D., Saksena, S. & Emr, S. D. SnapShot: the ESCRT machinery. *Cell* **137**, 182–182.e1 (2009).
78. Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H. & Brech, A. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic Cph. Den.* **10**, 925–937 (2009).
79. Roma-Rodrigues, C. *et al.* Tumor Microenvironment Modulation via Gold Nanoparticles Targeting Malicious Exosomes: Implications for Cancer Diagnostics and Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
80. van Niel, G. *et al.* The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev. Cell* **21**, 708–721 (2011).
81. Verweij, F. J. *et al.* LMP1 association with CD63 in endosomes and secretion via exosomes limits constitutive NF- κ B activation. *EMBO J.* **30**, 2115–2129 (2011).
82. Trajkovic, K. *et al.* Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* **319**, 1244–1247 (2008).
83. Mittelbrunn, M. & Sánchez-Madrid, F. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 328–335 (2012).
84. Minciacchi, V. R., Freeman, M. R. & Di Vizio, D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin. Cell Dev. Biol.* **40**, 41–51 (2015).
85. Keerthikumar, S. *et al.* ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J. Mol. Biol.* **428**, 688–692 (2016).
86. Faught, E., Henrickson, L. & Vijayan, M. M. Plasma exosomes are enriched in Hsp70 and modulated by stress and cortisol in rainbow trout. *J. Endocrinol.* **232**, 237–246 (2017).
87. Clayton, Aled; Turkes, Atilla; Navabi, Hossein; Mason, Malcom D.; Tabi, Zsuzsanna. Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *J. Cell Sci.* **118**, 3631–3638 (2005).
88. Escola, J. M. *et al.* Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **273**, 20121–7 (1998).
89. Skotland, T., Sandvig, K. & Llorente, A. Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Prog. Lipid Res.* **66**, 30–41 (2017).
90. Wubbolts, R. *et al.* Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J. Biol. Chem.* **278**, 10963–10972 (2003).
91. Llorente, A. *et al.* Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**, 1302–1309 (2013).
92. Laulagnier, K. *et al.* Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem. J.* **380**, 161–171 (2004).
93. Lötvall, J. *et al.* Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J. Extracell. Vesicles* **3**, 26913 (2014).
94. Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 654–659 (2007).
95. Montecalvo, A. *et al.* Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* **119**, 756–766 (2012).
96. Mittelbrunn, M. *et al.* Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat. Commun.* **2**, 282 (2011).
97. Pegtel, D. M. *et al.* Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 6328–6333 (2010).
98. Chen, T. S. *et al.* Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic Acids Res.* **38**, 215–224 (2009).
99. Melo, S. A. *et al.* Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis. *Cancer Cell* **26**, 707–721 (2014).
100. Gibbings, D. J., Ciaudo, C., Erhardt, M. & Voinnet, O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1143–1149 (2009).
101. Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I. & Illei, G. G. The majority of microRNAs detectable in

- serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS ONE* **7**, 1–5 (2012).
102. Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A. & Burwinkel, B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.* **39**, 7223–7233 (2011).
 103. Arroyo, J. D. *et al.* Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 5003–5008 (2011).
 104. Nolte-'t Hoen, E. N. M. *et al.* Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res.* **40**, 9272–9285 (2012).
 105. Chen, F. *et al.* The functional roles of exosomes-derived long non-coding RNA in human cancer. *Cancer Biol. Ther.* **0**, 1–10 (2019).
 106. Cai, J. *et al.* Extracellular vesicle-mediated transfer of donor genomic DNA to recipient cells is a novel mechanism for genetic influence between cells. *J. Mol. Cell Biol.* **5**, 227–238 (2013).
 107. Takahashi, A. *et al.* Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nat. Commun.* **8**, 1–14 (2017).
 108. Thakur, B. K. *et al.* Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res.* **24**, 766–769 (2014).
 109. Kahlert, C. *et al.* Identification of doublestranded genomic dna spanning all chromosomes with mutated KRAS and P53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *J. Biol. Chem.* **289**, 3869–3875 (2014).
 110. Torralba, D. *et al.* Priming of dendritic cells by DNA-containing extracellular vesicles from activated T cells through antigen-driven contacts. *Nat. Commun.* **9**, 2658 (2018).
 111. Carthew, R. W. & Sontheimer, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**, 642–655 (2009).
 112. Davis, B. N. & Hata, A. Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell Commun. Signal.* **7**, 18 (2009).
 113. He, L. & Hannon, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 522–531 (2004).
 114. Calin, G. A. *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 15524–15529 (2002).
 115. Hayashita, Y. *et al.* A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* **65**, 9628–9632 (2005).
 116. Hamam, R. *et al.* Circulating microRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers. *Cell Death Dis.* **8**, e3045 (2017).
 117. Huang, Y. & Yu, J. Circulating microRNAs and long non-coding RNAs in gastric cancer diagnosis : An update and review. **21**, 9863–9886 (2015).
 118. Zhao, Y., Song, Y., Yao, L., Song, G. & Teng, C. Circulating microRNAs: Promising Biomarkers Involved in Several Cancers and Other Diseases. *DNA Cell Biol.* **36**, 77–94 (2017).
 119. Zhao, L. *et al.* Isolation and Identification of miRNAs in exosomes derived from serum of colon cancer patients. *J. Cancer* **8**, 1145–1152 (2017).
 120. Ge, Q. *et al.* miRNA in Plasma Exosome is Stable under Different Storage Conditions. *Molecules* **19**, 1568–1575 (2014).
 121. Nedaeinia, R. *et al.* Circulating exosomes and exosomal microRNAs as biomarkers in gastrointestinal cancer. *Cancer Gene Ther.* **24**, 48–56 (2017).
 122. Rabinowits, G., Gerçel-Taylor, C., Day, J. M., Taylor, D. D. & Kloecker, G. H. Exosomal MicroRNA: A Diagnostic Marker for Lung Cancer. *Clin. Lung Cancer* **10**, 42–46 (2009).
 123. Poroyko, V. *et al.* Exosomal miRNAs species in the blood of small cell and non-small cell lung cancer patients. *Oncotarget* **9**, 19793–19806 (2018).
 124. Chen, I.-H. *et al.* Phosphoproteins in extracellular vesicles as candidate markers for breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 3175–3180 (2017).
 125. Melo, S. A. *et al.* Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* **523**, 177–182 (2015).
 126. Moon, P.-G. *et al.* Fibronectin on circulating extracellular vesicles as a liquid biopsy to detect breast cancer. *Oncotarget* **7**, 40189–40199 (2016).
 127. Hoshino, A. *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **527**, 329–335 (2015).
 128. Chen, W. *et al.* Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit

- chemoresistance by a horizontal transfer of microRNAs. *PLoS One* **9**, e95240 (2014).
129. Zheng, P. *et al.* Exosomal transfer of tumor-associated macrophage-derived miR-21 confers cisplatin resistance in gastric cancer cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **36**, 53 (2017).
 130. Yuwen, D.-L., Sheng, B.-B., Liu, J., Wenyu, W. & Shu, Y.-Q. MiR-146a-5p level in serum exosomes predicts therapeutic effect of cisplatin in non-small cell lung cancer. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **21**, 2650–2658 (2017).
 131. Qin, X. *et al.* Cisplatin-resistant lung cancer cell-derived exosomes increase cisplatin resistance of recipient cells in exosomal miR-100-5p-dependent manner. *Int. J. Nanomedicine* **12**, 3721–3733 (2017).
 132. Ifergan, I., Scheffer, G. L. & Assaraf, Y. G. Novel extracellular vesicles mediate an ABCG2-dependent anticancer drug sequestration and resistance. *Cancer Res.* **65**, 10952–10958 (2005).
 133. Kreger, B. T., Johansen, E. R., Cerione, R. A. & Antonyak, M. A. The Enrichment of Survivin in Exosomes from Breast Cancer Cells Treated with Paclitaxel Promotes Cell Survival and Chemoresistance. *Cancers* **8**, (2016).
 134. Yin, J. *et al.* Secretion of annexin A3 from ovarian cancer cells and its association with platinum resistance in ovarian cancer patients. *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 337–348 (2012).
 135. Berman, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242 (2000).
 136. Bateman, A. *et al.* UniProt: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **45**, D158–D169 (2017).
 137. Sanner, M. F. Python: a programming language for software integration and development. *J. Mol. Graph. Model.* **17**, 57–61 (1999).
 138. Wang, M., Herrmann, C. J., Simonovic, M., Szklarczyk, D. & von Mering, C. Version 4.0 of PaxDb: Protein abundance data, integrated across model organisms, tissues, and cell-lines. *Proteomics* **15**, 3163–3168 (2015).
 139. Goodsell, D. Cellular Landscapes in Watercolor. *J. Biocommun.* **40**, (2016).
 140. Gardner, A., Autin, L., Barbaro, B., Olson, A. J. & Goodsell, D. S. CellPAINT: Interactive Illustration of Dynamic Mesoscale Cellular Environments. *IEEE Comput. Graph. Appl.* **38**, 51–66 (2018).
 141. Johnson, G. T. *et al.* cellPACK: a virtual mesoscope to model and visualize structural systems biology. *Nat. Methods* **12**, 85–91 (2015).
 142. Ibanez de Caceres, I. *et al.* IGFBP-3 hypermethylation-derived deficiency mediates cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* **29**, 1681–1690 (2010).
 143. Vera, O. *et al.* DNA Methylation of miR-7 is a Mechanism Involved in Platinum Response through MAFG Overexpression in Cancer Cells. *Theranostics* **7**, 4118–4134 (2017).
 144. Vilá, M. R. *et al.* New pancreas cancers cell lines that represent distinct stages of ductal differentiation. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **72**, 395–404 (1995).
 145. Ji, R. *et al.* Exosomes derived from human mesenchymal stem cells confer drug resistance in gastric cancer. *Cell Cycle Georget. Tex* **14**, 2473–2483 (2015).
 146. Friedländer, M. R., Mackowiak, S. D., Li, N., Chen, W. & Rajewsky, N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res.* **40**, 37–52 (2012).
 147. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods San Diego Calif* **25**, 402–408 (2001).
 148. Aebersold, R. & Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198–207 (2003).
 149. MANUAL DE PROTEÓMICA. Payhip Available at: <https://payhip.com/b/FNT7>. (Accessed: 29th March 2019)
 150. Schmidt, A., Picotti, P. A. & Aebersold, R. Proteomanalyse und Systembiologie. 3
 151. López-Ferrer, D. *et al.* Statistical model for large-scale peptide identification in databases from tandem mass spectra using SEQUEST. *Anal. Chem.* **76**, 6853–6860 (2004).
 152. MacLean, B. *et al.* Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **26**, 966–968 (2010).
 153. Kuhn, M. & Johnson, K. *Applied Predictive Modeling*. **26**, (New York, NY: Springer, 2013).
 154. Trevor, H., Robert, T. & J. H., F. *The elements of statistical learning: data mining, inference, and prediction*. (New York, NY: Springer, 2009).
 155. Gareth, J., Witten, D., Hastie, T. & Tibshirani, R. *An introduction to statistical learning: with applications in R*. (Springer New York, 2013).

156. H Rashed, M. *et al.* Exosomes: From Garbage Bins to Promising Therapeutic Targets. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 538 (2017).
157. Kalra, H., Drummen, G. & Mathivanan, S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 170 (2016).
158. Beach, A., Zhang, H.-G., Ratajczak, M. Z. & Kakar, S. S. Exosomes: an overview of biogenesis, composition and role in ovarian cancer. *J. Ovarian Res.* **7**, 14 (2014).
159. Mathivanan, S., Ji, H. & Simpson, R. J. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *J. Proteomics* **73**, 1907–1920 (2010).
160. Théry, C., Zitvogel, L., Amigorena, S. & Roussy, I. G. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 569–579 (2002).
161. Gonzalez-Begne, M. *et al.* Proteomic analysis of human parotid gland exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT). *J. Proteome Res.* **8**, 1304–14 (2009).
162. Clayton, A. *et al.* Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **18**, 977–9 (2004).
163. Denzer, K., Kleijmeer, M. J., Heijnen, H. F., Stoorvogel, W. & Geuze, H. J. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J. Cell Sci.* **113 Pt 19**, 3365–74 (2000).
164. Buschow, S. I. *et al.* MHC class II-associated proteins in B-cell exosomes and potential functional implications for exosome biogenesis. *Immunol. Cell Biol.* **88**, 851–856 (2010).
165. Théry, C. *et al.* Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **166**, 7309–18 (2001).
166. Gruenberg, J. & Maxfield, F. R. Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 552–63 (1995).
167. Kharaziha, P. *et al.* Molecular profiling of prostate cancer derived exosomes may reveal a predictive signature for response to docetaxel. *Oncotarget* **6**, 21740–54 (2015).
168. Mears, R. *et al.* Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* **4**, 4019–31 (2004).
169. Lamparski, H. G. *et al.* Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J. Immunol. Methods* **270**, 211–26 (2002).
170. Morita, E. *et al.* Identification of human MVB12 proteins as ESCRT-I subunits that function in HIV budding. *Cell Host Microbe* **2**, 41–53 (2007).
171. White, J. T., Tootygin, D., Cohen, R., Murphy, N. & Hilser, V. J. Structural Stability of the Coiled-Coil Domain of Tumor Susceptibility Gene (TSG)-101. *Biochemistry* **56**, 4646–4655 (2017).
172. Stricher, F., Macri, C., Ruff, M. & Muller, S. HSPA8/HSC70 chaperone protein: structure, function, and chemical targeting. *Autophagy* **9**, 1937–54 (2013).
173. Lau, T.-L., Kim, C., Ginsberg, M. H. & Ulmer, T. S. The structure of the integrin α 5 β 3 transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling. *EMBO J.* **28**, 1351–61 (2009).
174. Ronquist, G. K., Larsson, A., Stavreus-Evers, A. & Ronquist, G. Prostatosomes are heterogeneous regarding size and appearance but affiliated to one DNA-containing exosome family. *Prostate* **72**, 1736–1745 (2012).
175. Ronquist, G. K. *et al.* Prostatosomal DNA characterization and transfer into human sperm. *Mol. Reprod. Dev.* **78**, 467–476 (2011).
176. Ronquist, K. G., Ronquist, G., Carlsson, L. & Larsson, A. Human prostatosomes contain chromosomal DNA. *Prostate* **69**, 737–743 (2009).
177. Palanisamy, V. *et al.* Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes. *PLoS ONE* **5**, (2010).
178. Chan, K. C. *et al.* Analysis of the Human Serum Proteome. *Clin. Proteomics* **1**, 101–226 (2004).
179. Koritzinsky, E. H., Street, J. M., Star, R. A. & Yuen, P. S. T. Quantification of Exosomes. *J. Cell. Physiol.* **232**, 1587–1590 (2017).
180. Yoshioka, Y. *et al.* Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types. *J. Extracell. Vesicles* **2**, (2013).
181. Aatonen, M. T. *et al.* Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* **3**, (2014).
182. Burkhart, J. M. *et al.* The first comprehensive and quantitative analysis of

- human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood* **120**, e73-82 (2012).
183. Tauro, B. J. *et al.* Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods* **56**, 293–304 (2012).
 184. Latysheva, N. *et al.* Syntenin-1 Is a New Component of Tetraspanin-Enriched Microdomains: Mechanisms and Consequences of the Interaction of Syntenin-1 with CD63. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 7707–7718 (2006).
 185. Iavello, A. *et al.* Role of Alix in miRNA packaging during extracellular vesicle biogenesis. *Int. J. Mol. Med.* **37**, 958–966 (2016).
 186. Goodsell, D. S. *The Machinery of Life*. (Springer New York, 2009). doi:10.1007/978-0-387-84925-6
 187. Klein, T. *et al.* Instant Construction and Visualization of Crowded Biological Environments. *IEEE Trans. Vis. Comput. Graph.* **24**, 862–872 (2018).
 188. Dennis, G. *et al.* DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* **4**, R60 (2003).
 189. Johnston, A. P. R. *et al.* Journey to the centre of the cell: Virtual reality immersion into scientific data. *Traffic* **19**, 105–110 (2018).
 190. Johnson, G. T. *et al.* 3D molecular models of whole HIV-1 virions generated with cellPACK. *R. Soc. Chem.* **169**, 23–44 (2014).
 191. Goodsell, D. S. & Jenkinson, J. Molecular Illustration in Research and Education: Past, Present and Future. *J. Mol. Biol.* **430**, 3969–3981 (2018).
 192. Engholm, D. H., Kilian, M., Goodsell, D. S., Andersen, E. S. & Kjærgaard, R. S. A visual review of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**, 854–879 (2017).
 193. Goodsell, D. S. Illustrations of the HIV Life Cycle. in *The Future of HIV-1 Therapeutics* **389**, 243–252 (Springer, Cham, 2015).
 194. Ammanuel, S., Brown, I., Uribe, J. & Rehani, B. Creating 3D models from Radiologic Images for Virtual Reality Medical Education Modules. *J. Med. Syst.* **43**, 166 (2019).
 195. Meet the exosome, the rising star in drug delivery. *Chemical & Engineering News* Available at: <https://cen.acs.org/business/start-ups/Meet-exosome-rising-star-drug/96/i31>.
 196. Behance. Inside Cells: Molecular Biology and Biochemistry. *Behance* Available at: <https://www.behance.net/gallery/12470329/Inside-Cells-Molecular-Biology-and-Biochemistry>.
 197. Lo, C.-A. *et al.* Quantification of Protein Levels in Single Living Cells. *Cell Rep.* **13**, 2634–2644 (2015).
 198. Liu, T. *et al.* EVmiRNA: a database of miRNA profiling in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Res.* **47**, D89–D93 (2019).
 199. Mincheva-Nilsson, L., Baranov, V., Nagaeva, O. & Dehlin, E. Isolation and Characterization of Exosomes from Cultures of Tissue Explants and Cell Lines. *Curr. Protoc. Immunol.* **115**, 14.42.1-14.42.21 (2016).
 200. Théry, C. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles* **7**, 1535750 (2018).
 201. Harris, D. A. *et al.* Exosomes Released from Breast Cancer Carcinomas Stimulate Cell Movement. *PLOS ONE* **10**, e0117495 (2015).
 202. Hong, C.-S., Muller, L., Whiteside, T. L. & Boyiadzis, M. Plasma exosomes as markers of therapeutic response in patients with acute myeloid leukemia. *Front. Immunol.* **5**, 160 (2014).
 203. Kharmate, G., Hosseini-Beheshti, E., Caradec, J., Chin, M. Y. & Guns, E. S. T. Epidermal Growth Factor Receptor in Prostate Cancer Derived Exosomes. *PLOS ONE* **11**, e0154967 (2016).
 204. Cheng, L. *et al.* Exosomes from Melatonin Treated Hepatocellularcarcinoma Cells Alter the Immunosuppression Status through STAT3 Pathway in Macrophages. *Int. J. Biol. Sci.* **13**, 723–734 (2017).
 205. Villarroja-Beltri, C. *et al.* ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins. *Nat. Commun.* **7**, 13588 (2016).
 206. Domenis, R. *et al.* Pro inflammatory stimuli enhance the immunosuppressive functions of adipose mesenchymal stem cells-derived exosomes. *Sci. Rep.* **8**, 13325 (2018).
 207. Xu, C.-G., Yang, M.-F., Ren, Y.-Q., Wu, C.-H. & Wang, L.-Q. Exosomes mediated transfer of lncRNA UCA1 results in increased tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **20**, 4362–4368

- (2016).
208. Chen, W.-X. *et al.* Exosomes from docetaxel-resistant breast cancer cells alter chemosensitivity by delivering microRNAs. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **35**, 9649–9659 (2014).
 209. Wei, Y. *et al.* Exosomal miR-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient ER-positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **147**, 423–431 (2014).
 210. Chen, M.-J., Cheng, Y.-M., Chen, C.-C., Chen, Y.-C. & Shen, C.-J. MiR-148a and miR-152 reduce tamoxifen resistance in ER+ breast cancer via downregulating ALCAM. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **483**, 840–846 (2017).
 211. Qu, L. *et al.* Exosome-Transmitted IncARSR Promotes Sunitinib Resistance in Renal Cancer by Acting as a Competing Endogenous RNA. *Cancer Cell* **29**, 653–668 (2016).
 212. Yin, J. *et al.* Exosomal transfer of miR-1238 contributes to temozolomide-resistance in glioblastoma. *EBioMedicine* **42**, 238–251 (2019).
 213. Crow, J. *et al.* Exosomes as mediators of platinum resistance in ovarian cancer. *Oncotarget* **8**, 11917–11936 (2017).
 214. Zhang, Y., Li, M. & Hu, C. Exosomal transfer of miR-214 mediates gefitinib resistance in non-small cell lung cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **507**, 457–464 (2018).
 215. Yuwen, D. *et al.* Prognostic Role of Circulating Exosomal miR-425-3p for the Response of NSCLC to Platinum-Based Chemotherapy. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **28**, 163–173 (2019).
 216. Qin, X. *et al.* Exosomal miR-196a derived from cancer-associated fibroblasts confers cisplatin resistance in head and neck cancer through targeting CDKN1B and ING5. *Genome Biol.* **20**, 12 (2019).
 217. Tabak, S., Schreiber-Avissar, S. & Beit-Yannai, E. Extracellular vesicles have variable dose-dependent effects on cultured draining cells in the eye. *J. Cell. Mol. Med.* **22**, 1992–2000 (2018).
 218. Bunggulawa, E. J. *et al.* Recent advancements in the use of exosomes as drug delivery systems. *J. Nanobiotechnology* **16**, (2018).
 219. Didiot, M.-C. *et al.* Exosome-mediated Delivery of Hydrophobically Modified siRNA for Huntingtin mRNA Silencing. *Mol. Ther.* **24**, 1836–1847 (2016).
 220. Kozomara, A. & Griffiths-Jones, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **42**, D68–73 (2014).
 221. Alles, J. *et al.* An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Res.* **47**, 3353–3364 (2019).
 222. Backes, C. *et al.* Prioritizing and selecting likely novel miRNAs from NGS data. *Nucleic Acids Res.* **44**, e53 (2016).
 223. Beckers, M. *et al.* Comprehensive processing of high-throughput small RNA sequencing data including quality checking, normalization, and differential expression analysis using the UEA sRNA Workbench. *RNA* **23**, 823–835 (2017).
 224. Cheng, L., Sun, X., Scicluna, B. J., Coleman, B. M. & Hill, A. F. Characterization and deep sequencing analysis of exosomal and non-exosomal miRNA in human urine. *Kidney Int.* **86**, 433–444 (2014).
 225. Liu, X., Yuan, W., Yang, L., Li, J. & Cai, J. miRNA Profiling of Exosomes from Spontaneous Hypertensive Rats Using Next-Generation Sequencing. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **12**, 75–83 (2019).
 226. Hughes, T. R. ‘Validation’ in genome-scale research. *J. Biol.* **8**, 3 (2009).
 227. Stewart, D. J. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **63**, 12–31 (2007).
 228. Luo, J. *et al.* A novel panel of microRNAs provides a sensitive and specific tool for the diagnosis of breast cancer. *Mol. Med. Rep.* **10**, 785–791 (2014).
 229. Redova, M. *et al.* Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma. *J. Transl. Med.* **10**, 55 (2012).
 230. Riquelme, I. *et al.* miR-101-2, miR-125b-2 and miR-451a act as potential tumor suppressors in gastric cancer through regulation of the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cell. Oncol. Dordr.* **39**, 23–33 (2016).
 231. Guduric-Fuchs, J. *et al.* Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. *BMC Genomics* **13**, 357 (2012).
 232. Kanaoka, R. *et al.* Usefulness of Plasma Exosomal MicroRNA-451a as a Noninvasive Biomarker for Early Prediction of Recurrence and Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncology* **94**, 311–323 (2018).

233. Takahasi, K. *et al.* Usefulness of exosome-encapsulated microRNA-451a as a minimally invasive biomarker for prediction of recurrence and prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Hepato-Biliary-Pancreat. Sci.* **25**, 155–161 (2018).
234. TIAN, Y. *et al.* MicroRNA miR-451 downregulates the PI3K/AKT pathway through CAB39 in human glioma. *Int. J. Oncol.* **40**, 1105–1112 (2011).
235. Wang, W. *et al.* Involvement of miR-451 in resistance to paclitaxel by regulating YWHAZ in breast cancer. *Cell Death Dis.* **8**, e3071 (2017).
236. Gu, X., Li, J.-Y., Guo, J., Li, P.-S. & Zhang, W.-H. Influence of MiR-451 on Drug Resistances of Paclitaxel-Resistant Breast Cancer Cell Line. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **21**, 3291–3297 (2015).
237. Sun, X., Lou, L., Zhong, K. & Wan, L. MicroRNA-451 regulates chemoresistance in renal cell carcinoma by targeting ATF-2 gene. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* **242**, 1299–1305 (2017).
238. Cheng, D., Xu, Y., Sun, C. & He, Z. MicroRNA-451 sensitizes lung cancer cells to cisplatin through regulation of Mcl-1. *Mol. Cell. Biochem.* **423**, 85–91 (2016).
239. Liu, K., Tian, H., Zhang, Y., Zhao, H. & Ma, K. miR-451 selectively increases sensitivity to cisplatin in ERCC1-high non-small cell lung cancer cells. *J. Cell. Biochem.* (2018).
240. Kovalchuk, O. *et al.* Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 2152–2159 (2008).
241. Dickman, C. T. D. *et al.* Selective extracellular vesicle exclusion of miR-142-3p by oral cancer cells promotes both internal and extracellular malignant phenotypes. *Oncotarget* **8**, 15252–15266 (2017).
242. Cao, X.-C. *et al.* miR-142-3p inhibits cancer cell proliferation by targeting CDC25C. *Cell Prolif.* **49**, 58–68 (2016).
243. Hua, S., Liu, C., Liu, L. & Wu, D. miR-142-3p inhibits aerobic glycolysis and cell proliferation in hepatocellular carcinoma via targeting LDHA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **496**, 947–954 (2018).
244. Mansoori, B. *et al.* miR-142-3p is a tumor suppressor that inhibits estrogen receptor expression in ER-positive breast cancer. *J. Cell. Physiol.* (2019).
245. Mansoori, B. *et al.* miR-142-3p as tumor suppressor miRNA in the regulation of tumorigenicity, invasion and migration of human breast cancer by targeting Bach-1 expression. *J. Cell. Physiol.* **234**, 9816–9825 (2019).
246. Zhang, Y., Liu, Y. & Xu, X. Upregulation of miR-142-3p Improves Drug Sensitivity of Acute Myelogenous Leukemia through Reducing P-Glycoprotein and Repressing Autophagy by Targeting HMGB1. *Transl. Oncol.* **10**, 410–418 (2017).
247. Chen, Y., Zhou, X., Qiao, J. & Bao, A. MiR-142-3p Overexpression Increases Chemo-Sensitivity of NSCLC by Inhibiting HMGB1-Mediated Autophagy. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **41**, 1370–1382 (2017).
248. Gao, X. *et al.* MicroRNA-142-3p Promotes Cellular Invasion of Colorectal Cancer Cells by Activation of RAC1. *Technol. Cancer Res. Treat.* **17**, (2018).
249. Li, Y. *et al.* Oncogenic microRNA-142-3p is associated with cellular migration, proliferation and apoptosis in renal cell carcinoma. *Oncol. Lett.* **11**, 1235–1241 (2016).
250. Zhu, J., Tian, X., Zhang, Y., Bai, Y. & Pei, K. MiR-142-3p is a tumor promoter by directly targeting FOXO4 to promote gastric cancer cell growth and suppress cell apoptosis in gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol* **9**, 12079–12087 (2016).
251. Hasegawa, T. *et al.* Characterization and Evidence of the miR-888 Cluster as a Novel Cancer Network in Prostate. *Mol. Cancer Res. MCR* **16**, 669–681 (2018).
252. Lee, H.-Y., Han, S.-S. & Song, S.-Y. Serum microRNAs as potential biomarkers for lung cancer. *Ann. Oncol.* **27**, (2016).
253. Won, K. Y. *et al.* MicroRNA-199b-5p is involved in the Notch signaling pathway in osteosarcoma. *Hum. Pathol.* **44**, 1648–1655 (2013).
254. Braoudaki, M. *et al.* MicroRNA expression signatures predict patient progression and disease outcome in pediatric embryonal central nervous system neoplasms. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **7**, (2014).
255. Wang, Q. *et al.* Transcription factor KLF13 inhibits AKT activation and suppresses the growth of prostate carcinoma cells. *Cancer Biomark. Sect. Dis. Markers* **22**, 533–541 (2018).
256. Huang, J., Dibble, C. C., Matsuzaki, M. & Manning, B. D. The TSC1-TSC2 Complex Is

- Required for Proper Activation of mTOR Complex 2. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 4104–4115 (2008).
257. Zhang, L. *et al.* Overexpression of SLC7A11: a novel oncogene and an indicator of unfavorable prognosis for liver carcinoma. *Future Oncol. Lond. Engl.* **14**, 927–936 (2018).
258. Sunaga, N. & Kaira, K. Epi-regulin as a therapeutic target in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* **6**, 91–98 (2015).
259. Barber, R. D., Harmer, D. W., Coleman, R. A. & Clark, B. J. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol. Genomics* **21**, 389–395 (2005).
260. Eisenberg, E. & Levanon, E. Y. Human housekeeping genes, revisited. *Trends Genet.* **29**, 569–574 (2013).
261. Villarroya-Beltri, C., Baixauli, F., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Madrid, F. & Mittelbrunn, M. Sorting it out: regulation of exosome loading. *Semin. Cancer Biol.* **28**, 3–13 (2014).
262. Tanaka, Y. *et al.* Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* **119**, 1159–1167 (2013).
263. Tokuhisa, M. *et al.* Exosomal miRNAs from Peritoneum Lavage Fluid as Potential Prognostic Biomarkers of Peritoneal Metastasis in Gastric Cancer. *PLOS ONE* **10**, e0130472 (2015).
264. Li, X. J., Ren, Z. J., Tang, J. H. & Yu, Q. Exosomal MicroRNA MiR-1246 Promotes Cell Proliferation, Invasion and Drug Resistance by Targeting CCNG2 in Breast Cancer. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **44**, 1741–1748 (2017).
265. Que, R., Ding, G., Chen, J. & Cao, L. Analysis of serum exosomal microRNAs and clinicopathologic features of patients with pancreatic adenocarcinoma. *World J. Surg. Oncol.* **11**, 219 (2013).
266. Warnecke-Eberz, U., Chon, S.-H., Hölscher, A. H., Drebbler, U. & Bollschweiler, E. Exosomal onco-miRs from serum of patients with adenocarcinoma of the esophagus: comparison of miRNA profiles of exosomes and matching tumor. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **36**, 4643–4653 (2015).
267. Samsonov, R. *et al.* Lectin-induced agglutination method of urinary exosomes isolation followed by mi-RNA analysis: Application for prostate cancer diagnostic. *The Prostate* **76**, 68–79 (2016).
268. Wang, J. *et al.* Combined detection of serum exosomal miR-21 and HOTAIR as diagnostic and prognostic biomarkers for laryngeal squamous cell carcinoma. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* **31**, 148 (2014).
269. Matsumura, T. *et al.* Exosomal microRNA in serum is a novel biomarker of recurrence in human colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **113**, 275–281 (2015).
270. Byun, J.-S., Hong, S.-H., Choi, J.-K., Jung, J.-K. & Lee, H.-J. Diagnostic profiling of salivary exosomal microRNAs in oral lichen planus patients. *Oral Dis.* **21**, 987–993 (2015).
271. Lange, T. *et al.* Identification of miR-16 as an endogenous reference gene for the normalization of urinary exosomal miRNA expression data from CKD patients. *PLoS One* **12**, e0183435 (2017).
272. Lv, L.-L. *et al.* MicroRNA-29c in urinary exosome/microvesicle as a biomarker of renal fibrosis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **305**, F1220–F1227 (2013).
273. Xie, Z. *et al.* Salivary microRNAs as promising biomarkers for detection of esophageal cancer. *PLoS One* **8**, e57502 (2013).
274. Gouin, K. *et al.* A comprehensive method for identification of suitable reference genes in extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* **6**, 1347019 (2017).
275. Li, Y. *et al.* Identification of Endogenous Controls for Analyzing Serum Exosomal miRNA in Patients with Hepatitis B or Hepatocellular Carcinoma. *Dis. Markers* **2015**, (2015).
276. Ni, Q. *et al.* Different signatures of miR-16, miR-30b and miR-93 in exosomes from breast cancer and DCIS patients. *Sci. Rep.* **8**, 12974 (2018).
277. Cortés-Sempere, M. *et al.* IGFBP-3 methylation-derived deficiency mediates the resistance to cisplatin through the activation of the IGFR/Akt pathway in non-small cell lung cancer. *Oncogene* **32**, 1274–1283 (2013).
278. Zhang, Y., Hao, T., Zhang, H., Wei, P. & Li, X. [Over-expression of miR-151a-3p inhibits proliferation and migration of PC-3 prostate cancer cells]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi Chin. J. Cell. Mol. Immunol.* **34**, 247–252 (2018).
279. Zhang, K. *et al.* Circulating miRNA profile in esophageal adenocarcinoma. *Am. J. Cancer Res.* **6**, 2713–2721 (2016).
280. Zeng, A. *et al.* Exosomal transfer of miR-151a enhances chemosensitivity to

- temozolomide in drug-resistant glioblastoma. *Cancer Lett.* **436**, 10–21 (2018).
281. Zheng, G. *et al.* Identification and validation of reference genes for qPCR detection of serum microRNAs in colorectal adenocarcinoma patients. *PLoS One* **8**, e83025 (2013).
282. Titov, S. E. *et al.* Selection and validation of miRNAs as normalizers for profiling expression of microRNAs isolated from thyroid fine needle aspiration smears. *Oncol. Rep.* **36**, 2501–2510 (2016).
283. Yates, J. R., Ruse, C. I. & Nakorchevsky, A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **11**, 49–79 (2009).
284. Mathivanan, S. *et al.* Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **9**, 197–208 (2010).
285. Pisitkun, T., Shen, R.-F. & Knepper, M. A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 13368–13373 (2004).
286. Duijvesz, D. *et al.* Proteomic Profiling of Exosomes Leads to the Identification of Novel Biomarkers for Prostate Cancer. *PLOS ONE* **8**, e82589 (2013).
287. Gangoda, L. *et al.* Proteomic Profiling of Exosomes Secreted by Breast Cancer Cells with Varying Metastatic Potential. *Proteomics* **17**, (2017).
288. Saiki, I. Cell adhesion molecules and cancer metastasis. *Jpn. J. Pharmacol.* **75**, 215–242 (1997).
289. Shain, K. H. & Dalton, W. S. Cell Adhesion Is a Key Determinant in de Novo Multidrug Resistance (MDR): New Targets for the Prevention of Acquired MDR. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 69–78 (2001).
290. Sherman-Baust, C. A. *et al.* Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Cell* **3**, 377–386 (2003).
291. Januchowski, R., Zawierucha, P., Ruciński, M., Nowicki, M. & Zabel, M. Extracellular Matrix Proteins Expression Profiling in Chemoresistant Variants of the A2780 Ovarian Cancer Cell Line. *BioMed Res. Int.* **2014**, (2014).
292. Mermelekas, G., Vlahou, A. & Zoidakis, J. SRM/MRM targeted proteomics as a tool for biomarker validation and absolute quantification in human urine. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **15**, 1441–1454 (2015).
293. Gillet, J.-P., Varma, S. & Gottesman, M. M. The Clinical Relevance of Cancer Cell Lines. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 452–458 (2013).
294. Ahn, S. G. *et al.* LOXL2 expression is associated with invasiveness and negatively influences survival in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **141**, 89–99 (2013).
295. Moreno-Bueno, G. *et al.* Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2), a new regulator of cell polarity required for metastatic dissemination of basal-like breast carcinomas. *EMBO Mol. Med.* **3**, 528–544 (2011).
296. Le Calvé, B. *et al.* Lysyl oxidase family activity promotes resistance of pancreatic ductal adenocarcinoma to chemotherapy by limiting the intratumoral anticancer drug distribution. *Oncotarget* **7**, 32100–32112 (2016).
297. Yuan, X. *et al.* ATF3 suppresses metastasis of bladder cancer by regulating gelsolin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Res.* **73**, 3625–3637 (2013).
298. Yuan, X. *et al.* Gelsolin suppresses gastric cancer metastasis through inhibition of PKR-p38 signaling. *Oncotarget* **7**, 53459–53470 (2016).
299. Shieh, D.-B. *et al.* Cell motility as a prognostic factor in Stage I nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* **85**, 47–57 (1999).
300. Rao, J. *et al.* Tissue microarray analysis of cytoskeletal actin-associated biomarkers gelsolin and E-cadherin in urothelial carcinoma. *Cancer* **95**, 1247–1257 (2002).
301. de Jong, O. G., van Balkom, B. W. M., Gremmels, H. & Verhaar, M. C. Exosomes from hypoxic endothelial cells have increased collagen crosslinking activity through up-regulation of lysyl oxidase-like 2. *J. Cell. Mol. Med.* **20**, 342–350 (2016).
302. Hamm, A. *et al.* Frequent expression loss of Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain (ITI_H) genes in multiple human solid tumors: a systematic expression analysis. *BMC Cancer* **8**, 25 (2008).
303. Mai, C. *et al.* Decreased ITIH5 expression is associated with poor prognosis in primary gastric cancer. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* **31**, 53 (2014).
304. Chen, H. *et al.* Aberrant methylation of

- FBN2 in human non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst. Neth.* **50**, 43–49 (2005).
305. Hibi, K. *et al.* FBN2 methylation is detected in the serum of colorectal cancer patients with hepatic metastasis. *Anticancer Res.* **32**, 4371–4374 (2012).
306. Tsunoda, S. *et al.* Methylation of CLDN6, FBN2, RBP1, RBP4, TFPI2, and TMEFF2 in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* **21**, 1067–1073 (2009).
307. Herman, J. G. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Semin. Cancer Biol.* **9**, 359–367 (1999).
308. Sempere, L. F. Integrating contextual miRNA and protein signatures for diagnostic and treatment decisions in cancer. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **11**, 813–827 (2011).
309. Gremm, D. & Wegner, A. Gelsolin as a calcium-regulated actin filament-capping protein. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4339–4345 (2000).
310. Kawase, A. *et al.* Differences between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung: are adenocarcinoma and squamous cell carcinoma prognostically equal? *Jpn. J. Clin. Oncol.* **42**, 189–195 (2012).
311. Goldstraw, P. *et al.* The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* **11**, 39–51 (2016).

Anexos

ANEXOS

ANEXO 1. Listado de miARNs conocidos y noveles sobre-representados en los exosomas de los subtipos celulares resistentes a CDDP en comparación con su parental sensible.

A			B		
miARNs conocidos			miARNs noveles		
H23R>H23S	A2780R>A2780S	41MR>41M	H23R>H23S	A2780R>A2780S	41MR>41M
hsa-miR-509-3-5p	hsa-miR-218-5p	hsa-miR-144-3p	hsa-miR-novel-chr20_36434		hsa-miR-novel-chr8_73345
hsa-miR-4446-3p	hsa-miR-1269a	hsa-miR-514a-3p	hsa-miR-novel-chr12_8435		hsa-miR-novel-chr11_5149
hsa-miR-374b-5p		hsa-miR-892a	hsa-miR-novel-chr16_18708		hsa-miR-novel-chr3_48344
hsa-miR-892a		hsa-miR-142-3p	hsa-miR-novel-chr4_55745		hsa-miR-novel-chr7_67784
hsa-miR-4488		hsa-miR-1269b	hsa-miR-novel-chr8_71627		
hsa-miR-340-5p		hsa-miR-1295a	hsa-miR-novel-chr8_71938		
hsa-miR-146a-5p		hsa-miR-891a-5p	hsa-miR-novel-chr9_75892		
hsa-let-7e-5p		hsa-miR-122-5p	hsa-miR-novel-chr6_63803		
hsa-miR-574-3p		hsa-miR-1271-5p	hsa-miR-novel-chr16_20827		
hsa-miR-363-3p		hsa-miR-375	hsa-miR-novel-chr19_27503		
hsa-miR-451a		hsa-miR-141-3p	hsa-miR-novel-chr10_1863		
hsa-miR-200a-5p		hsa-miR-582-3p	hsa-miR-novel-chr2_44500		
hsa-miR-223-3p		hsa-miR-363-3p	hsa-miR-novel-chr9_73956		
hsa-miR-150-5p		hsa-miR-744-5p	hsa-miR-novel-chr17_22431		
hsa-miR-142-3p		hsa-miR-888-5p	hsa-miR-novel-chr18_24557		
hsa-miR-891a-5p		hsa-miR-135a-5p	hsa-miR-novel-chr18_24558		
		hsa-miR-576-3p	hsa-miR-novel-chr1_32463		
		hsa-miR-451a	hsa-miR-novel-chr14_16127		
		hsa-miR-412-5p	hsa-miR-novel-chr5_57817		
		hsa-miR-148a-5p	hsa-miR-novel-chr6_64323		
		hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-novel-chr6_63220		
		hsa-miR-424-3p	hsa-miR-novel-chr22_40711		
		hsa-miR-10a-3p			
		hsa-miR-148a-3p			
		hsa-miR-1262			
		hsa-miR-1299			
		hsa-miR-423-5p			
		hsa-miR-25-3p			
		hsa-miR-200a-3p			
		hsa-miR-96-5p			

ANEXO 2. Listado de proteínas identificadas en el análisis proteómico shotgun. Se muestran los nombres de los genes que codifican para cada proteína, y en amarillo los que coinciden con el listado de ExoCarta.

H23S								H23R								
THBS1	POSTN	RSU1	SEPT2	LGMN	CCDC180	GOLGA4	NPTX1	THBS1	CLU	PTX3	ANGPTL3	PHACTR4	CNN2	FRY	AGRN	
ACTB	CLEC11A	CCT4	MGAT1	HRNR	RGN	EMILIN1	AHSG	A2M	NPTX1	PXDN	ACTR2	PDIA3	CTAGE1	MAP2K1	TUBA4A	
ACTG1	VTN	ACHE	CYR61	RPS25	B4GALT5	SPOCK2	ITIH1	ACTB	KRT9	PYGL	ULK3	DDX39B	NEB	ZNF134	TUBB	
CD81	VIM	PARVB	CORO1A	GPI	KIF7	TNFSF18	HBB	ACTG1	SERPIND1	LAMA2	ERP44	ACP1	HIVEP3	DDX52	ITIH3	
A2M	EFEMP1	APOH	SERPINH1	TALDO1	EFCC1	NCBP1	KRT2	CD81	LUM	CHIA	LAP3	LCAT	RPL18	SLC2A13	ACTN1	
FN1	LAMC1	HIST2H3A	MAT1A	CSPG4	ITSN1	TACC2	COMP	FN1	CLEC11A	APOA1	FGA	DDX3X	IFIT1	TMPPRS11A	AHSG	
FLNA	APOE	VCL	SMPD1	PKD2L2	S100A11	PPP1R9A	TUBB4B	GAPDH	ACTBL2	PLOD3	PTPRZ1	KCNF1	BBS1	NCOA6	VTN	
ALB	GC	PSMB3	PSMB4	SNX2	TMEM163	MRS2	HSPG2	FLNA	ENO3	HIST2H3A	ACTR1B	OR2T2	SRGIN1	FN3KRP	HSPG2	
GAPDH	LUM	LTf	INVS	FBN2	CDH5	ALAS1	SERPIND1	ALB	LAMA5	ALDH9A1	PLVAP	FBN2	OPTN	DNAJA1	KRT10	
TUBA1B	C1QTNF3	NPTX2	PAICS	A1BG	PRG4	PARP8	KRT9	TUBA1B	LAMC1	GSTP1	LMNA	FAM3C	PRIM1	CENPH	APOE	
TUBA1A	TAGLN2	FERMT3	PSMB2	GSTA1	SARS	BCL2L10	ENO3	TUBA1A	LAMB1	PLEC	RGPD1	PHGDH	GPX3	RCF5	THBS4	
HSP90A81	COL6A1	PTPRF	IL6ST	DPYSL2	LGALS1	CAPZA1	CLU	HSP90A81	SEMA3C	MAPRE2	RPLP0P6	PRDX4	ATP6V1B2	LKR1	TUBB4B	
ENO1	IGF2R	CACNA2D1	PLA2G7	UGP2	EEF1B2	TYW3	PCDH18	HSPA8	LOXL2	SERPINF2	SND1	EPRS	STRAP	BIN1	HBD	
HSP90AA1	C5	RPS27A	NQO1	DSTN	POLR3B	FBIN5	ANKRD34B	PKM	EFEMP1	KRT17	ACHE	COL9A1	B2M	PTPN21	LRP1	
ACTN4	EEF1A1P5	HIST1H3A	GGH	NPTXR	LPPR4	AP1G1	NUGGC	ENO1	KRT2	C8B	CTSD	ZDBF2	HS6ST1	HMMR	POSTN	
HSPA8	AFP	SCG2	NPEPPS	PTK7	RPS4Y1	PRIM1	IGSF8	VCP	COMP	KRT75	G6PD	BRD8	NISCH	MOB1B	PGAM1	
PP1A	AMY1A	PCOLCE	COL9A1	RPL18	NLRP2	USP8	RHOC	EEF2	KRT6A	CACNA2D1	TGFB2	SPTBN1	INPP1	PLEKHA6	PCDH12	
EEF2	AGRN	OGN	CPE	EXT2	MEP1A	FHOD3	DCAF8	PGK1	COL6A1	LTBP3	PFKP	F11	CCDC105	PCDHGC3	CFB	
PKM	TNC	HGD	C8B	LYPLA1	APPL1	CPN1	LKLR1	HSP90AA1	KRT16	SHBG	ME1	GALK1	PPP1R9A	PRR11	HSP90B1	
UBA1	PSAP	PTPRS	FAM104A	ADH5	IFJ35	NBN	PDLM1	ACTN4	C5	DPYSL2	CTSZ	CHD9	NUDC	AASDH	HGD	
PGK1	LAMB1	EEF1G	NID2	PNP	ZNF280A	PTPN21	C12orf63	LDHA	VIM	RELN	PTK7	EEF1D	NPTX2	TXK	DMBT1	
HSPA1A	AMY2A	MYH14	PHGDH	ZDBF2	AAAS	FAM83G	LTBP3	HSPA1A	TUBB3	KRT18	CSPG4	OR2W3	TC2N	SLC26A3	PSMA1	
LDHB	PLG	PSMB6	FEN1	CTSZ	GM2A	ZBTB4	EHD2	LDHB	PLAU	PGD	EFEMP2	PLXNB2	TMEM27	IBTK	COL5A2	
VCP	FGF	B3GNT1	OIT3	ADM2	CUL4A	RPS6KB1	APOPT1	PP1A	EEF1A1P5	PTPRF	CORO1C	CCDC93	SLC26A10	TTC3	HRNR	
LDHA	LTBP4	PGD	HSPA13	NUTF2	E1F5A2	SMC1A	NME2	SDCBP	TAGLN2	SPATA19	MBTPS1	MEDE6	ATP13A1	UNC80	PSMA5	
MSN	PLOD1	SPATA19	CTSB	COL15A1	IFIT1	ARMC2	ATP4B	TPP1	GC	ADAMTS13	NOTCH2	GLTSCR1	SATB2	TMEM5	HSPB1	
YWHAZ	GNS	APOA1	MAN1A1	CTAGE1	SLC2A14	FMO5	PTT1	AHCY	IGF2R	APMAP	QSOX1	PCMT1	FHOD3	LPPR4	PGAM4	
CFL1	INADL	ITIH4	RBP4	PCOLCE2	KTN1	CHD2	C12orf4	MYH9	PLG	TNXXB	IL6ST	SCG2	SLTM	ASS1	WDR1	
AHCY	SERPINC1	CHIA	FAT4	HMCN1	CHTF8	NPAS4	ASS1	HSPA5	C1QTNF3	MDH1	GSTA5	PLXDC2	GALNT4	NCAM1	GNS	
TPP1	CNTN1	ALDH9A1	SPP2	CCDC13	KIF4A	ABC810	GPX3	CFL1	C7	CDT8	TPP1	IGF2	ARHGEF37	FRK	SERPINA10	
RAP1B	COL6A3	GPATCH8	CTSD	ME1	DNAH1	GNA12	PRRC2A	HIST1H4A	KRT14	TBCK	SPP2	FANCI	PRKG1	ZNF280A	STC1	
HSPA5	VWF	NOTCH2	PPID	SEPT7	NUP155	TBC1D8	POTEC	CLTC	PSAP	MASBP1	LTBP2	NME2	MOC53	SYNE2	CDH11	
KPNB1	APOC3	COL5A2	GANAB	PLXNB2	FNBP1	AASDH	TRABD2A	YWHAZ	AMY1A	COTL1	NID2	HSPA13	FAM83G	FMO5	SPOCK2	
CLIC1	SERPINA7	SHBG	TTN	SERPINA5	TAP1	SMYD4	PLCE1	YWHAZ	PLOD1	INVS	CAT	MCMA4	PCOLCE2	BRCA2	UGP2	
YWHAZ	F5	NAP1L1	SPTBN1	FAM3C	CAT	DIP2C	MTPN	RAN	F5	OLFML3	NAP1L4	AP4S1	NRP1	TBC1D2	PDLM1	
PFN1	TNXXB	RAB10	RAB11B	MARCKSL1	VEP1	FANCI	BRD9	MSN	CNTN1	RPS27A	DSTN	CRMP1	USP14	LRRC7	SEMA3A	
ALDOA	KRT6B	F13B	GMFG	CCDC18	TIAM1	COPB1	COX5B	TKT	AMY2A	PSMB1	NPEPPS	TTR	C8A	F9	APOA4	
HIST1H4A	MRC2	VASN	ADAMTSL4	KCTD11	AHCYL2	LAMA3	ACE	PFN1	FGF	RAB10	CBR1	TDRD6	HSPH1	N4BP3	ACTR3	
YWHAQ	C7	FSCN1	S100A6	CTSC	MFAP5	MTHFD1	CPA6	KPNB1	THBS3	PCOLCE	AFM	ARPC1B	ZFR2	CYP2C8	FBN1	
CLTC	F13A1	HABP2	COPS6	ASL	WDR43	TRIM32	DNAJC14	CLIC1	LTBP4	TFPI2	FABP5P3	AMBP	CCDC18	ADAMTSL2	ROBO4	
EZR	KRT8	VGF	FLG2	CDH11	HRG	DISP2	MMP2	GD12	COL6A3	COL1A2	RUVBL1	TMCC1	ILK	ATP4B	MAT1A	
YWHAZ	WDR1	FAT1	LTAAH	OXR1	FAM53A	B2M	RPL35	ALDOA	TUBB1	KRT8	SPMP1	PPM1F	NTN4	NSUN5P2	COL3A1	
CCT2	NOTCH3	CAND1	IGF2	ALDH1A1	SETD1B	LRR8C8D	CAPZB	LGALS3BP	FGG	EIF3B	ASPN	SCRIB	ATP11B	MYO1F	VGF	
ACLY	THBS3	PLEK	ERC2	DCDC5	MAP2K1	HS6ST1	APOA4	ANXA2	SERPINC1	NRP2	RBP4	TM2C	TUBG2	AKR1B15	TGFB1	
RAN	CAP1	HSPB1	MBTPS1	TUBG1	OR2W6P	TKX	IGJ	ITGB1	VWF	CSE1L	LRG1	MASBP2	INSR	CCDC19	RPL5	
GD12	VASP	EEF1D	COL1A1	PLXDC2	EFCAB2	CYP2C8	GSTM3	FASN	APOC3	GPATCH8	WARS	LUZP1	CPPED1	ENGASE	FAT4	
YWHAZ	KRT5	SERPINA10	MOS	C2	GLO1	NCAM1	MYL6B	CTC3	AFP	ITIH4	ITGA2	EML4	PDGFRB	CD36	RPSA	
MYH9	FGG	LMNA	ADAMTSL2	RPSA	CCDC170	FTMT	ANXA2P2	YWHAZ	C9	RSU1	VASN	NQO1	NPR2	TRMT1	PRDX6	
ITGB1	FLNC	CORO1C	ARPC5	CALD1	DYNC1H1	CYFIP2	ISLR	YWHAQ	CAP1	IGFBP2	PRSS2	PLA2G7	PHF21B	FARS8	B3GNT1	
CD9	CRH	DPY5	PRDX6	ILK	WARS	GNA13	NRP1	TCP1	MRC2	PSMA3	PCBP1	UMOD	ARPC4	LRRC8D	HMCN2	
RAB1A	PGAM1	CTSL	CYP2F1	MED6	TSKU	CNBD1	COL3A1	CCT2	HIST2H2BF	CTSL	PPP1R2	RPL12	ELAVL3	SOX6	ADH5	
CCT5	PSMA5	ART4	CHST14	PHACTR4	VSTM2B	ARHGDI4	IGFBP2	YWHAZ	COL12A1	F13B	COL15A1	KMT2D	DMD	SCUBE3	PNP	
TKT	LOXL2	MDH1	CD97	PCBP1	PPM1F	CCDC171	EFEMP2	MFG8	KRT5	PARVB	PEPD	MYO7A	CHST14	KNDC1	GSTA1	
GNB1	FLNB	IGLL5	ACTR2	LAP3	ARHGEF37	THRAP3	UBAC2	PRDX2	VASP	LTf	CALR	MIF	CHST14	EDEM3	OR6M1	
CD42	CFB	PGM1	BGN	HMCN2	RPL5	CFH	RAB8B	RAB7A	FMOD	FSCN1	CCT7	ADSL	FKBP4	ZNF484	ERC2	
PRDX2	GRN	QSOX1	CKB	UBE4A	SHMT1	C8A	RPLP0P6	ACLY	N/A	SUPT6H	PROS1	ARR3	CCDC6	NABP2	ITGA3	
CCT3	PSMA2	PSMA4	AFM	LGALS1	APOC2	ZNF610	PSMA3	CCT5	PLTP	OGN	CPE	TAP1	HMGCL1	MAST3	OXR1	
FASN	EIF4A1	ANGPTL3	GSTA5	ELAVL3	NALCN	TRRAP	PLVAP	CD9	HIST1H2AG	CFI	RRP1B	PCLO	KCTD11	DNM2	S100A12	
PRDX1	COTL1	SERPINF2	OMD	IDH1	HIP1	RPL31	ROBO4	PRDX1	HIST3H2BB	MYL6	TIE1	PKHD11L	KIF7	CYLD	HEXB	
ANXA11	BHMT	FGA	EIF2S1	TPP1	CSR1P	GALNT15	ITGA2	UBA1	PSMA4	ART4	PPP2R1A	HSPA4	AHNAK	METTL21EP	LAMA3	
SDCBP	VCAM1	PYGL	NEO1	IPOS	ARR3	ATL1	RAB18	CD42	SERPINA7	NEO1	NUMA1	ADAMTSL4	BIRC6	FRAS1	HHP12	
TCF1	PXDN	PSMB1	ADK	OR6M1	ITPR3	ANKRD36C	NID1	GNB1	VCL	PTPRS	SACS	CD97	RAI14	G8A	GM2A	
F2	C9	PKLR	CRMP1	MOC53	MORF4L2	H6PD	ADAMTS13	RAB1A	APOH	ARF3	CLP1	KIF4A	ALDH1A1	RFC1	ARPC5	
TG	PSMA6	APOM	SACS	ARPC4	DCTN1	CPPED1	COL12A1	F2	BHMT	NID1	PEBP1	SEPT9	CCDC64	COPB1	RFPL1	
C3	TGFB1	QRO126	QPCT	ERP44	BRIP1	VPS52	LAMA5	TG	FLNC	FEN1	PGM1	PIP4K2A	DYNC1H1	KIF6	MORF4L2	
TLN1	OLFML3	LCA1	MINK1	DDX47	RPL34	ARFGEF3	MASBP1	C3	FLNB	GRN	PLEK	NUP160	GSTA3	CNBD1	TPM3	
FBIN1	DMBT1	STC1	COL18A1	TMCC1	SLC22A8	MARVELD2	KRT18	CP	VCAM1	APOM	GSS	BRD9	MAT2A	GTF3C1	KIF26B	
HBA1	TUBB1	NGG12	GSS	PROS1	PSMB5	DOCK7	LAMA2	TLN1	EIF4A1	CAND1	OMD	EEF1B2	TACC2	RTKN2	CPN1	
GSN	HIST1H2AG	ABHD8	RAB40C	FYN	ARF3	N4BP2	APMAP	TNC	PSMB3	EEF1G	CNDP2	HLA-A	SPEG	CYFIP2	RPS2	
ITIH2	FMOD	NEB	FAP	SH3PX2B	ARPC2	C17orf78	HSP90B1	ITIH2	NOTCH3	IGLL5	GPR126	C1orf101	ETV7	NCBP1	TLL110	
P2P	TIE1	PGM2	LAMB2	TDRD6	CYLD	SLC24A4	HIST3H2BB	ITIH2	PSMB6	C2	OIT3	DHX9	PSMB4	LRR9C	SEPT11	
ACTC1	PSMA1	PSMC5	SUPT6H	AMBP	HSPH1	UNC80	PCDH12	FBIN1	PSMA6	TALDO1	COL4A2	PSMB9	EXT2	GOT1L1	BPGM	
APOB	HEXB	GD11	GLOD4	GALNT4	GAREML	KIAA0020	ACTR3	GSN	HPD	PSMB7	CPA6	POLR3B	PSMD11	FAAH2	PLCE1	
C4A	MAPRE2	CCT7	TFPI2	AKR1A1	RNGTT	TLL110	BMP7	P2P	FERMT3	KIAA2012	UBAC2	RAB40C	LTA4H	BRWD3	RUVBL2	
KRT1	HIST2H2BF	PCMT1	UMOD	ZBTB43	CCDC105	AKR1B15	SLC39A11	ACTC1	F13A1	FAT1	ARAP1	KLKB1	ALAS1	C17orf78	CD33	
ITIH3	LAMA1	PSMB7	ACP1	HHP12	LRRC71	TTR	PCYOX1L	SERPINF1	PSMA7	NAP1L1	SPTBN2	PRRC2A	RAB1B	VWASA	DNPH1	
SERPINF1	F10	GSTP1	SEPT11	SLAIN1	RB1	PKD1L2	PCDHGC3	C4A	PAICS	SERPINH1	MMP2	CAPZB	EVPL	MRPL32	ZYX	
KRT10	FBN1	RELN	RBP1B	ASPN	SLITRK2	HNRNPC	CDCC88A	APOB	PSMA2	FAP	LGALS1	SERPINA5	HYOU1	BEST2	GFTP1	
LRP1	PSMA7	F111														

A2780S										A2780R																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
PDCD6	FBLN1	IGF2R	PSMA5	KIF5B	GSTP1	SUPT6H	SHMT1	HMCN2	THBS1	CFH	PPT1	C8B	ADAMTS13	AKR1A1	MPST	HSP90A1	GSN	TUBB4B	P2P	NOTCH3	AARS	CTT7	RPS3	EIF2S1	RPS5	PSMC1	DXX5	TXK	FASN	SERPINF1	KRT10	CANO1	PFAS	ACEH	GSP1	NPEPP5	CALR	H5SRP	SSRP1	TTTH3	RGPD1	XPO1	EIF2S1	SNRPD3	EIF3A	MAR5	PRCP	RTCB	EIF3L	PSMD2	SF3B1	B4GALT1	PPP2CA	GALM	TPM3	OMD	CHIA	CTSD	PTK7	MSM4	PLS3	LGR1	PCDH18	GGH	PEPD	IGLL5	DDX39A	TIMP1	ARPC3	MIF	NEU1	SHMT2	ASPM	FBP2	HNRNPC	HABP2	PDGFRB	OS9	PTPRD	RPL5	TALDO1	COL2A1	ALDH1A1	TXK	AFM	ABCE1	RPS20	MASP2	RELN	CDH11	PLVAP	QSOX1	BMPT	IPOS	F9	CRYZ	MGAT2	DXH8	SEPT9	LMRPA1	ALDOB	COP5A	IZUMO4	XRCC5	ATP4B	SATB2	DUAJB1	AOX1	KIAA1107	TFE3	SPATA19	C2	RPS15A	PDIA3	HMGCL1	LPL	CNDP2	CLP1	BIRC6	ALAS1	CCDC154	MLLT6	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2	RPS24	POLR3B	K1C2	PRMT5	CL2orf57	GTF3C1	WDR72	PCLCE2	FBLN5	NUTF2	COL6A2

ANEXOS

41M										41MR									
CD81	DNAH12	KRT18	CAP1	SERPINA1	PRKAR2A	HAPLN3	ME1	ACTB	TLN1	EIF4A1	RPL12	MYL6	RPL7A	SSB					
THBS1	SYMFK	AFP	FGG	NPEPPS	USO1	DIAPH1	ERH	ACTG1	KRT10	LAMC1	APMAP	F9	CORO1C	DNAJA1					
ACTB	NBN	AMY1A	NUMA1	RUVBL2	LYPLA1	CLIC3	TCEA1	A2M	HBA1	LAMB1	EIF3H	MDH1	CTAGE1	CPA6					
ACTG1	BAIAP2	PXDN	NID1	XPO1	FBN2	HSPB1	MUC1	THBS1	FBLN1	EEF1G	RPLP0	DHX9	FAT1	FRY					
FASN	ARCN1	EEF1G	ASS1	PSMB1	SMPD1	DNPEP	RP54X	GNB1	ITIH2	VIM	PRKDC	RP53A	ARR3	CPA1					
FN1	AASDH	TINAGL1	PGAM1	PSMC2	EML2	CTSV	SARS	FN1	GSN	NID2	TALDO1	TPR	PLOD1	A1BG					
FLNA	VPS35	LAMB3	EFEMP2	ALDH9A1	CLDN6	HPD	CAPZA1	ALB	ACTC1	C9	ACTR3	STRAP	ADK	POLR3B					
PKM	SDAD1	HIST1H3A	PSMB6	RPS27A	SBN02	NRAP	PLEC	HSPA8	ITIH3	F13A1	PSMD2	PSMC3	FEN1	CD36					
A2M	TACC2	FLNB	CAD	SERPINF2	EIF2S1	NONO	RABGAP1	FLNA	PZP	PSMA7	HSP90B1	CSE1L	UBAC2	MB21D1					
GAPDH	RP57	F5	F10	APOA1	DDX39B	FAT4	LDLR	TUBA1B	KRT9	F10	SERPINF2	PARVB	COPS3	CYP2C8					
HIST1H4A	ABCB10	APOC3	PSMA5	SUPT6H	ITIH4	DNAJA1	CORO1A	EEF2	NID1	TUBB1	ADAMTS13	APOM	RAC2	B4GALT1					
LGALS3BP	MKLN1	COL6A1	DOB1	IPO5	MDH1	SERPINH1	GGH	HSP90A1	APOB	CCT8	PTPRF	S100A12	PRKAR2A	OLA1					
HSP90AA1	ANKRD62	LAMB1	ACTR3	CFB	PTPRS	DARS	SACS	TUBA1A	KRT2	HIST2H3A	PLVAP	RGPD1	AMBP	SN1					
HSPA8	ATG16L2	IDH1	PROM1	MASP1	PLAU	RPL14	CAT	GAPDH	ITIH1	PSMA6	OLFML3	RPL11	COL21A1	CAT					
HSP90AB1	TLN1	EFEMP1	PSMD2	TENM3	PHPT1	PSMD6	SSB	HSP90AA1	SERPINF1	PSMA2	AFM	IGSF8	KIF5B	KTN1					
ALB	KRT1	C5	SPTAN1	EPBS	ABCE1	CNDP2	FAM63A	RAB14	AHS	NOTCH3	TNC	GART	RPL4	ELMSAN1					
TUBA1B	FBLN1	HIST2H3A	COTL1	RPL7A	SEPT2	COL5A1	OLA1	PKM	C4A	FBN1	RUVBL2	VNN1	F13B	USO1					
ENO1	KRT10	DYNC1H1	VCAM1	CSE1L	FLG2	TUBG2	FAT1	ENO1	TUBB	PGAM1	LTF	ABCE1	HNRNPH1	PLXNB2					
TUBA1C	HBA1	PLG	PSMA7	PLOD1	TARS	COP56	PRG4	HSPA1A	AFP	WDR1	PSMB3	PTK7	CRAC1	TCEA1					
PGK1	TNC	PRKDC	RPLP0	APOA4	GPC4	UBAC2	RPL7	FASN	THBS4	PSMA4	PSMA5	RVB1L1	RAB1B	DNAJA2					
EEF2	ITIH2	LMNA	B3GNT1	LAMA2	NPTX1	HSPD1	NPM1	PIIA	LRP1	VCL	PDLIM1	RPLP1	RPL27A	G6PD					
CLTC	APOB	POSTN	FERMT3	HNRNPU	RPL11	COL3A1	FARSA	PGK1	TUBA4A	B3GNT1	NAP1L4	MASP2	PCOLCE	ROBO4					
MYH9	TUBB	C7	PSMA2	OLFML3	AARS	IGFBP2	ALDOC	EEF1A1	HBD	PSMA1	SUPT6H	GNB2L1	HAPLN3	RP1A					
UBA1	KRT9	KRT27	COL12A1	AGRN	PDLIM1	AKR1A1	ITGAV	MFGE8	TUBB4B	GANAB	PSMC5	MIF	OMD	RAB11B					
ACTN4	KRT2	KRT17	KTN1	RPS11	CACNA2D1	PDGFC	ROBO4	UBA1	KRT16	GLA	COL12A1	PLA2G7	S100A11	OXSR1					
HSPA1A	LAMA3	FGB	APMAP	MAPRE2	PSMB5	SLC1A5	TNPO1	LDHA	KRT14	LTBP4	COL1A1	PRPS2	RPS8	QPRT					
VCP	ACTC1	FBLN5	H2AF2	MYO1C	C8B	TRIM28	DSTN	LDHB	COL6A1	COL5A1	APOA4	LTBP1	PTX3	C2					
PIIA	APOE	PSMA4	PTPRF	HMGCS1	GNG12	NUCB1	MXRA5	HIST1H4A	APOE	EEF1D	INVS	LCAT	TIE1	AARS					
AHCY	TUBB4B	CLU	SPTBN1	PSMD11	DSP	NID2	DYNNL2	ITP1	COMP	COL6A3	EIF4A3	RPS4Y2	RPL10A	CCDC180					
EZR	AHS	GC	TGFB1	PARVB	PSMC5	RPL10A	COP3	CLTC	FBN2	FERMT3	MAT2A	CPE	KHDRBS2	RPL23					
YWHAE	LAMA5	KRT76	GNB2L1	PCBP2	NRP1	XRCC5	XRCC6	AHCY	VTN	C8B	PGAM4	BHMT2	CYP2F1	BB59					
GNAS	LAMB2	IMPDH2	RSU1	PPP2R1A	EIF3I	RPS2	PHACTR4	LGALS3BP	KRT77	NAP1L1	PCDH12	PRDXA	RPL18	AGRN					
ITP1	GSN	STRAP	PGD	ARF3	ABHD8	CORO1B	IPO4	KPNB1	KRT6B	HIST1H2AG	PPP2R1A	PCBP1	ERC2	ATP4B					
CCT2	LAMC1	TAGLN2	PGAM4	HRNR	QSOX1	RPS24	OMD	ACLY	TUBB2B	VASP	APOA1	EIF2S1	EML2	HSG6T1					
MSN	LRP1	VWF	SLC2A1	HABP2	PFN2	IGFALS	RBP4	ACTN4	SERPIND1	ART4	CFI	OR2W3	RPLP2	PSMB7					
CFI1	ITIH3	RPSA	FBLN2	EIF3H	ACO1	GSTM2	DYNC2L1	CD81	KRT6C	CAP1	PGD	ASNS	GALK1	GALNT4					
LDHB	SERPINF1	SERPINA7	PSMA1	TALDO1	EIF3B	CHIA	MTM1	CCT2	CIQTNF3	DYNC1H1	EIF3B	IFGFB2	SERPINH1	COL11A1					
ACLY	C4A	CAND1	RPL18	TPR	ADK	PLVAP	PCSK4	CCT3	PXDN	CHIA	SPATA19	HNRNPL	COL15A1	NPEPPS					
ANXA2	TUBA4A	PSMA6	RUVBL1	PAICS	CKB	KIF5A	PLXNB2	YWHAZ	GC	PLTP	ACHE	TTN	NRP2	CLIC4					
YWHAZ	KRT16	LTBP4	ACHE	SERPINA10	ST13P4	MON2	TLL7	TCPI	APOC3	CFB	HGFAC	COL14A1	S100A8	RAI14					
LDHA	THBS4	CCT4	OGN	RPS18	MAT1A	ATP6V1A	AFM	SDCBP	PHGDH	FLNB	HGD	USP14	PRM1	COPA					
HSPA5	HIST2H2BF	CCT8	VCL	VASN	PSMD13	RTCB	DNAJC10	YWHAE	AMY1A	PAICS	RSU1	RPS25	IGF2	NBEA					
STOM	PZP	EIF4A1	NAP1L1	FAM129B	FAM104A	CFI	PABPC1L	RAN	PLG	IDH1	HPD	SACS	TGFB3	PPM1F					
GD12	HIST3H2BB	EEF1D	MYL6	BHMT	KIF5B	COPB1	EIF3E	MSN	HSPG2	PSMA3	HSPD1	GLUL	ZDBF2	TGM3					
RAP1B	ITIH1	GSTP1	PSMC3	SND1	FBN1	RPS3A	CPN1	ALDOA	LUM	VCAM1	QSOX1	GSTA1	KPNA2	FBLN5					
PRDX1	KRT14	NOTCH3	HGD	PSMB4	RPL12	TACSTD2	IGF2	HSPA5	KRT5	TBCK	PSMB6	NEO1	MDG6	PRRC2A					
ALDOA	KRT6A	MYH14	FMOD	RPLP2	PA2G4	SEMA3F	PKHD1L1	CFI1	TAGLN2	HABP2	WNT5A	CLP1	TMC1	TDRD6					
CCT5	KRT6C	TNKB	EPCAM	RAB18	ISYNA1	RHX15	RPS5	MYH9	AMY2A	RPSA	IMPDPH2	PLS3	FAT4	MTAP					
KPNB1	COMP	WDR1	RPS3	EEA1	PRDX6	LTBP3	NUTF2	CCT5	ENO3	KPRP	PYGL	DDX3X	FAP	CHD9					
CCT3	KRT6B	APOH	PYGL	DHX9	HIC2	ARPC4	CREG1	PFN1	F5	SHBG	RPL32	FAM3C	FGA	B2M					
TCPI	HSPG2	LAMC2	PYGB	HSPA4	LGALS1	BST2	SRCIN1	PRDX2	C5	RPS27A	RPS2	NPM1	BRD9	CTPS1					
RAN	HBD	SERPINC1	PCBP1	PSMB2	COL1A1	CD47	PSMC1	RAP1B	C7	PSMB1	MASP1	MAGT1	CDH11	PHACTR4					
CD9	ACTN1	COL6A3	PLTP	EIF3A	RPL32	SEPT8	ACE	YWHAG	FGH	COL2A1	VASN	ASPAN	MAPRE2	MORF4L2					
SDCBP	KRT8	MRC2	CCT7	DMBT1	CILP	PSMC4	PCYOX1	YWHAB	SERPINA7	COTL1	IGLL5	NPTX1	FBP2	PCOLCE2					
CLIC1	HIST1H2AG	CLEC11A	SEPT7	GSTA1	NT5E	LAP3	IL6ST	CLIC1	PLAT	COCH	NUTF2	RBBP1	CLU	COL3A1					
ATP1A1	SERPIND1	PSMB3	TGFB2	ALPL	MTHFD1	ACTR2	ARHGDB1	VCP	POSTN	EPRS	LAMA5	ACTR2	GPATC8	PGM1					
PTGFRN	VTN	HSP90AB2P	PSMA3	CPVL	SPP2	CDH11	RG510	PRDX1	SERPINC1	CNTN1	RTCB	NONO	GSS	PKHD1L1					
PRDX2	HIST2H2AA3	CNTN1	PRPF19	RPL5	BANF1	SORD	OTUB1	ITGB1	INADL	MRC2	MTHFD1	PSMB9	XPO1	LAMB2					
MFGE8	EEF1A1P5	VASP	F13B	SHBG	RCC2	HNRNPL	ADAMTS12	YWHQAQ	ACTN1	ITIH4	LTBP3	HNRNPU	TAP1	CSP1					
PFN1	HIST3H2A	F13A1	KRT84	GALK1	ADSL	HMCN2	FARS8	PTGFRN	CTC4	TNXB	ERP44	HSPB1	CKB	AP1B1					
YWHQAQ	LUM	EIF4A2	WARS	NAP1L4	PARP1	NEO1	FAP	YWHAB	HIST2H2BF	SERPINA10	MYBL2	OR2T2	SRSF3	AIMP1					
ITGB1	CIQTNF3	PHGDH	ADAMTS13	RARS	RGN	RPL27A	SAR1A	CD9	KRT8	RGN	ANGPTL3	CAND1	WDR5	COL9A1					
ANXA5	KRT5	HSP90B1	GLUL	PSMC6	UGP2	NEK6	S100A12	RAB1A	APOH	FMOD	SPP2	HSPA4	ACTR1B	TXK					
GNB1	KRT19	TUBB1	PCDH12	TIE1	CPNE3	LCAT	CFHR1	RAB7A	KRT17	CCT7	CPN1	PEPD	RAB40C	ADAMTS12					
TKT	FAT2	CCT6A	SVEP1	EIF2S3	PDIA3	TLL10	PLEK	CDC42	FGG	COL18A1	HNRNPK	TGFB1	PSMB5	GSTA5					
ANXA11	KRT7	GANAB	RELN	RNPEP	NAPRT1	AHCYL2	PSMB7	TKT	EFEMP1	BHMT	CORO1A	FARS8	RGS10	VCAN					
YWHAB	IGF2R	C9	ERP44	CAPZB	QARS	LTF	C2	CP	IGF2R	DMBT1	OGN	PTPN11	RPL5	CREG1					
CDCA2	HGF	V-SRC	ITGA7	BPGM	CCD21B	MGAT2	PKPK	F2	HIST3H2BB	HRNR	RPL18	ADM2	CTSC	HRG					
YWHAG	PRIM2	RPS9	MAP3K5	PRSS35	CYFIP1	SULT2	PALLD	TG	VWF	CCT6A	PTPRS	CAPZB	PSAP	NCAM1					
RAB1A	PTK7	AP1M2	LDOC1L	CPA6	NTN4	CPA1	PSMD1	C3	FLG2	RELN	GD11	SPTBN1	CCDC65	VAT1					
TFRC	KIF7	SORL1	LEFTY2	CAPZA2	IARS	HUWE1	LPMR4	KRT1	CLEC11A	ALDH9A1	GSTP1	GGH	RPL13	PCMT1					
ANXA6	PKP3	COL18A1	CPNE1	CELSR2	PNP	DNM1C	SEPT9	N4BP3	LPPR4	C17orf78	ZNF280A	TMEM221	RPS11	CARM1					
RAB7A	FAH136A	ARHGAP20	PLS3	CTSD	MMP9	PLXDC2	CPPED1	JAKMIP3	CCDC19	LRRC9	DENND1A	PCLO	PTPN21	KCTD11					
RAB14	SUN5	RRBP1	GLD04	ANK2	NFKBID	PCYOX1L	ANKRD18A	TBC1D2	AHNAK	COMMD7	CCDC6	SIK2	GLTSCR1	FDPS					
B5G	LRRC8D	CCDC157	FKBP4	ANK2	B3GAT3	PEBP1	C1R	WDR41	ABCA13	RPL8	WDR18	DCAF13	TUBG2	DBNL					
RAB8A	TRPC4AP	ZNF726	APOM	PCOLCE	DPYSL2	RNF219	AMER2	RPTOR	MPP6	TKTL1	TLL10	VRK2	RPS18	LUZP1					
PDCD6IP	N/A	GDAPE2	FAM184A	MIF	CENPH	AKR1B1	GART	RANBP3L	PPID	PKN3	FTSJ3	PCSK6	LARS	ALBUM1					
RHOA	MUC6	PLCE1	OIT3	A1BG	MASP2	GFPT1	GARS	BNIP3L	AKR1B15	C12orf57	CFD	SPLL2B	PLXDC2	INA					
C3	ATR	PRKAA2	APOPT1	KIAA1462	CYP2F1	RAB10	MSH5	CYFIP2	CD46	STAB1	DUOX1	ALAS1	RAB10	PSMB2					
IG	PAX7	PRMT5	NRIP2	RAB11B	EIF3CL	HSPA9	TTR	ARMC2	N4BP2	ZNF610	PSMC1	ITPR3	ORSH2	UNC45B					
F2	FBLN7	XPO6	SCN1A	GPX3	KCTD11	S100A11	S100A2	ELAVL3	BOP1	TXNDC16	POMK	GARS	EEF1B2	CAD					
TBC1D4	PURG	LGMN	TTN	PCNT	KIT	EIF6	COL21A1	TMOD1	PAD14	NPR2	ELK1	FBXO21	ARHGEF37	CACNA2D1					
PRPS2	TKX	WNK1	EVPL	GSTA5	ITGA2	PLA2G7	H2AFY	PSMB4	SATB2	EFEMP2	ARPC2	FANCI	PRSS35	FAM179A					
CCDC172	RPL28	FBXL22	CDH23	C6orf183	COL9A1	ASL	GNS	CEMP1	ZCCHC11	GAS2L3	EIF2AK4	FHOD3	RNF219	IFIT1					
POLR2A	HIRA	MYO9A	PEPD	PGM1	EMLS	CAP5													

ANEXO 3. Análisis ontológico de las 22 proteínas candidatas

Proceso Biológico	Nº de Genes	Genes	p valor
Organización de la matriz extracelular	10	<i>TNC, FBN1, HSPG2, POSTN, NID1, NID2, AGRN, FBN2, THBS1, COL5A2</i>	<0,001
Desestructuración de la matriz extracelular	6	<i>A2M, GSN, FBN1, HSPG2, NID1, FBN2</i>	<0,001
Adhesión celular	6	<i>TNC, POSTN, MFGE8, NID2, THBS1, LOXL2</i>	<0,001
Respuesta a estímulos mecánicos	3	<i>TNC, POSTN, THBS1</i>	0,002
Metabolismo retinoide	3	<i>APOE, HSPG2, AGRN</i>	0,002
Ruta celular	Nº de Genes	Genes	p valor
Interacción receptor-MEC	5	<i>TNC, HSPG2, AGRN, THBS1, COL5A2</i>	<0,001
Adhesión focal	3	<i>TNC, THBS1, COL5A2</i>	0,027
Malaria	2	<i>HBA1, THBS1</i>	0,062
Ruta de señalización PI3K-Akt	3	<i>TNC, THBS1, COL5A2</i>	0,071

ANEXO 4. Niveles normalizados de cada miARN en la cohorte de 10 controles sanos

Control	Niveles normalizados miARNs (2 ^{-ΔCt})		
	miR-451a	miR-142	miR-55745
C1	333,049	9,928	0,206
C2	2053,957	26,953	0,226
C3	955,470	14,757	0,223
C4	1026,370	13,931	0,276
C5	517,327	10,548	0,467
C6	219,985	27,764	0,760
C7	343,823	18,405	0,523
C8	298,005	40,843	0,111
C9	1356,983	14,840	0,143
C10	337,373	3,075	0,141

ANEXO 5. Listado de genes diana potencialmente bajo regulación del miR-451a y del miR-142-3p. Se indican en amarillo los genes diana compartidos entre ambos

miR-451a															
ARHGEF3	CUX2	SOGA3	SEMA5A	MAU2	LPP	MAML1	CELSR1	UCK1	TTC21B	PDZRN3	POFUT2	ZNF644			
EVL	STK4	LSS	FAM168B	SEC23IP	SPPL3	TBX1	EREG	PITPNB	AEBP2	GD1I	OSR1	PITG1P			
TBC1D9B	PSMD11	SWAP70	CAB39	NKAIN2	DGCR14	FMNL3	OXCT1	BMP6	CSE1L	ZNF460	CTNNBIP1	SLITRK1			
RSF1	PDXK	POU3F2	RMND5A	SSU72	ADAM10	SMARCA2	SYS1	CBLN4	STOX2	YTHDF2	CPSF7	SPTB			
PSMB8	BACH2	POU3F1	CDKN2D	RNF217	SZRD1	ADARB1	NEDD9	WDFY2	SYNJ2	RPRM	LENG8	TBX18			
EGLN3	NIPAI	DGCR2	DISC1	KCTD10	BAK1	SETD5	DDX3Y	TSC1	ZNF106	SAMD4B	CERK	FBLN5			
CA5B	ACADL	TFCP2L1	PRR12	TRMT11	MEX3C	CCND1	Cxorf21	TRIM66	GRSF1	EIF2AK3	FAM91A1	FAM208B			
CPD	BCCIP	IL6R	AMZ1	ATRN	SPOCK2	ADCY7	TTN	RAB5A	TNFSF15	ARPP19	MAP3K1	KLF13			
ST8SIA4	ACADS8	ATF2	GADL1	CYB561D1	PRICKLE2	USP46	ZIC3	CTDSP1	ASTN2	STC1	KLF11	OXTN			
DCAF5	ANKRD52	MYOG	CDKN2B	MEOX2	AMMECR1L	PLEKHG2	PMM2	CXCL16	AKTIP	PCCB	CELF2	RAB14			
LSG1	PPARA	RASGEF1A	CMTM6	NRARP	KIF24	LUZP2	LPIN1	NSMAF	CPNE3	SPC25	YVHAZ	C8orf22			
SLC7A11	CRIP2	VANGL1	DBX2												
miR-142-3p															
FBXO3	ZBTB20	PSIP1	MAP3K11	MOB4	CALM1	LAMTOR3	MNS1	NR1D2	TMEM200B	CUL5	KCNK6	FSTL4			
DHX29	SLC22A23	FUT4	KMT2A	KDM5C	LANCL3	CD27	LIN7C	WNT5A	ZNF260	C22orf29	PEAK1	RAB3D			
SLC20A2	SFRP4	PATZ1	LATS1	BCL2L1	MYH9	TLDC2	PPARA	TMEM56	CUX1	ZNF395	LRR8B	TAB2			
KRT72	OPA3	CDKL2	MLL1	OGN	ZNF547	EARS2	RAB12	HFE	PLAG1	FGF23	GLTSCR1L	LPP			
RBM47	BTLA	APC	AFB1	LRR8C32	SOXA1	SERP1	PSRC1	TSC1	LMO3	RIMBP2	ER12				
AK5	VNN1	FUT1	MTMR7	KLF9	REXO2	AMER2	CHM	CLCN5	RBM12	AHCYL2	IMP1	MUTS1			
TVP23A	IBAS7	MEF2C	RAB35	PIP4K2B	MYLK	COPS7A	ZNF84	PPP3CA	DENND1B	SOC5	CISD2	LHCGR			
ABCA1	MYBL1	MEF2D	SGTB	TBX15	CPNE8	SP4	OR51E2	PPP3R1	RASGRP1	CNIH4	QKI	DRD1			
ANO7	MMGT1	CELF3	RREB1	IKZF1	SLC39A10	KIAA1755	CHRNA	ZFP90	IPO9	HMG2A	FZD3	CREB5			
MXRA7	APOA5	BIRC3	WDR5B	TWSG1	ZBTB41	SOX11	PCDHA9	CD302	KCTD12	SAMD12	TIGD6	LIFR			
EHF	ST6GALNAC3	XIAP	MLK11	ZFP36L2	TRIM6	RFDW3	CHMP5	PPP1R2	CCDC88A	CYP1A2	ZDHHC11	DPYSL2			
ABL2	SEC24A	C1orf102	ATP2A2	OTX1	BACH2	NFIB	ATF5	PPP1R3D	PIANP	LIN28A	MMD	DCUN1D4			
IQGAP1	IER3	ZNF549	COX20	GAS2	ZNF451	RANBP17	HSPA1B	CRYZL1	TRPS1	ZDHHC22	KSR2	FAM84A			
COP56	SLC1A3	CCL22	MCMBP	TCEB3	MYO5A	CD1D	CHRNA3	PPP1R10	CHAC1	PTER	PHF12	PSMB5			
ACSL1	SLC1A2	SMUG1	CCDC88C	BRCA2	KIAA2022	PLEKHA3	LCMT2	CLTA	TRPC5	KCNA6	ZNF367	SRGAP1			
C18orf54	ATXN1L	WASL	ATP1B1	PGPEP1	UBE2W	PEA15	WDR37	GOLGA5	LRR8C17	TBL1XR1	RBF0X2	LMAN1			
BOD1	SLCSA3	MCC	TMEM132E	ASB7	CASK	CCNT2	TAB3	HLA-DOA	PIK3CG	RBAK	PALM2	CLOCK			
ACSL4	EVC	CNTNAP3B	SLC30A9	OSBP	RMND5B	LRR8C19	ZEB2	AMMECR1	AP3S2	AAGAB	EP400	ZAK			
CKAP4	ZNF460	CROT	DHX33	ZEB1	TMEM140	LYRM2	EPM2AIP1	TAGAP	MPP5	KLF4	IL27RA	GOSR2			
C10orf90	PCDH15	KAT7	TGM1	TCF7	PTAR1	NHSL1	BTBD3	CPM	MBNL3	KCNA4	ALPK3	RGAG1			
NANP	GRPR5	ARF4	TGFB1	PATE1	SETBP1	GRM5	NKX2-3	ZCCHC5	HTRC2	TKTL2	TBX4	LLGL2			
TET3	SLC2A12	GABRA4	WDR20	TCF21	LMF1	PACRGL	DAZAP2	CPE	CTDSPL	VAMP3	KLHL42	ABCD3			
ACHE	DPY19L4	TMTC1	LXN	FNBP1L	GRHL1	WWTR1	ATP6V1G3	CPD	TSZ21	STXB4P	RSF1	ZNF226			
KLHL3	PROM1	SEMA6D	SLC36A1	PI15	VP553	MSI2	TNFRSF13C	PGM1	ANKRD46	NSRP1	SLC37A3	ZNF229			
C18orf25	CLFAR	TBC1D13	TGFB1	BMP4	OSBP3	SPATA6L	ZNF10	UTY	MMAB	FAM114A1	SLCO4C1	ZNF230			
SLC6A4	UBE2Z	GAB1	TGFB2	PAFAH1B2	NAGA	NFYC	SCRN1	UTRN	H2AFV	BRWD1	NUDT16	PSME4			
SLC6A6	WNK3	C5orf24	SLC11A2	BMP3	ABHD11	HEATR5A	CENPO	KDM6A	ELOVL6	B4GALT5	TAOK1	PGM2L1			
BLOC156	CDB4	AR	SLC35F6	ZNF845	CACNA1D	ZBTB10	KBTBD12	SOWAHB	MOB1B	RASGRF1	SEMA3D	LAMP3			
RAPH1	F2R	NAV1	PNO1	STX7	PPP1R37	FAM19A2	LRR59	FAM46A	MPZL2	GPRI37C	MON2	ZNF219			
NTN4	F9	FOXO1	TTC22	HMG20A	CDCP1	C20orf194	PEX5L	TUBB1	AMOTL1	ITPK8	ONECUT2	ZNF641			
PROSER2	ALDH1A2	NAV3	USP9Y	TMED7	SMARCA5	SEMA3C	ATG14	HAPLN1	TENM1	ZSWIM6	MARCKS	CTTN			
TNFSF10	HBSL1	RP56KA3	BACH1	TGF	EPN1	CDH2	FND3A	PBDC1	NR2C1	TARDBP	C21orf91	DIP2A			
SASH3	SIM1	ARL2	CLVS1	GABRG2	RNF141	PTPN23	R3HDM2	PFAS	TSEN34	SLC25A22	S1PR3	LGALS8			
CCDC3	ASAP2	ARL1	ZNF827	STRN3	RPDR1A	CLIC4	PALD1	CERS6	SUCO	ITPR3	NBP3	SLC36A2			
RBM27	KAT2B	BRWD3	PIK3R6	PCGF3	FAM127B	CDH6	SPRED1	FCRL3	SERPINB9	RP2	COL24A1	ZCCHC14			
MORF4L1	CDKS1	BTN3A2	MARCH1	NCK2	E2F7	SRP9	CFL2	PEX7	MEDAG	ZNF605	SMG1	ZMYM2			
KLHL15	SIKE1	ARNTL	TJP1	P4HA1	NUDT11	FAT3	ZNF28	CRK	TPM4	ZIC4	CSRNP2	RAB2A			
FGF9	CLDN2	FLNC	NTRK2	GABRB2	ADAM17	MYRIP	GDE1	SOX6	DLGAP2	ITGB8	FOXK2	RGL2			
LEMD1	STX12	CXCL9	PICALM	GABRB3	ANO2	ATG16L1	ZNF33B	IL6ST	C15orf54	SEPT3	ZHX3	RAB1A			
SREK1	SCN8A	FLT1	TIMP3	ZNF765	TADA2A	IPO7	INPP5F	UGT2B7	KIF11	C5orf51	ATG5	FBXO28			
ACVR2A	MAP2	BTN2A1	PARBP	CASZ1	FAM169A	YIPF6	LGR4	IL7R	VAPB	ZNF676	ARRDC3	RAB3A			
FDG2	EIF5A1	FMO2	ATP6V1A	DST	SYPL1	SLC38A4	PRLR	PTBP3	RDX	PDZD9	ROCK2	RAB3B			
RAB11A	SCN2B	SLC33A1	ATP6V1E1	MRPS16	PDS52	NECAP1	PROX1	UGT8	DMXL2	STAM	RICTOR	DMRTB1			
EDAR	CA5B	REPS2	CHMP7	TMEM110	HDAC2	TIPARP	SV2A	HNRNPDL	SPN51	CCDC6	PSMD11	IPMK			
PATL1	RNF24	POLR3A	ZNF558	FAM208B	CBL	NEBL	HMG41	RNF126	RAB40C	DYNC1L12	TMEM170B	SNX18			
ZNF480	MARK3	ELOVL7	FKBP14	GABRR1	SYT4	UNC5C	TRIM33	COL9A1	ZSWIM2	SYNRG	SMYD4	KIAA1217			
FOXF2	ATXN7	RNO3	NSF	GFR1A	ZC3H12B	CD6C	HMG81	PDE6B	USP22	KL	TMEM167A	CYTH4			
ZNF430	SLC7A11	AFF2	GHR	PAX6	CPEB2	CD5L	ZIC3	EML4	BTNL9	GXYLT1	ZNF682	EIF5A			
EDEM3	ZRANB1	MRAP1	GOLGA4	GF1	SYN2	SH2B1	ZNF689	UBE2H	PELO	KATNB1	TMEM559	RAC1			
MALT1	SCD	OSMR	GOLGA1	PBX1	TBL1X	BOD1L2	KLF13	SLC30A6	SBF2	ITGAV	PTGS2	MORF4L2			
SNX3	BICC1	ARHGEF2	TSPAN6	CREB3L2	TXLNA	TP53INP2	TLX1	EBF3	RHEB	ITGA2	ARHGAP26	DKK2			
PPARGC1A	CLDN12	FNTB	FAM102B	TET2	LRR1C	ATG2B	ST6GAL2	USH1C	ASH1L	FAM175A	TBC1D2B	LAMP2			
ADCY9	ZCCHC24	CNTNAP3	SP8	BNC2	NFAM1	STAU1	PRR23B	COL4A4	B3GNT5	IGDCC4	EBF1	CRTAM			
PLEKHA1	AKAP11	UNC13C	TNFRSF1B	FZD7	PLXDC1	OXR1	ZNF620	SCUBE3	KIF5A	MGA74A	TMEM181	AFF4			
FKBP1A	MZT1	CCN1	SIK1	LCA5	PPF1A1	PDE8B	CSGALNACT2	FAM198B	KIF5B	ZNF618	PTGER3	TRIM25			
ANKRD40	ARTN	TMTC2	DGCR14	ACBD3	ATP6V0D2	DUSP19	PAARD6B	PCSK1	FAM177A1	NRXN1	PLA2G12A	MANBAL			
C16orf70	MAGEA8	DIDO1	ITPR1P2	CALCOCO2	CELF2	MTMR9	TRIM66	FAM218A	NUMBL	WHAMM	PTGER2	EGR2			
ERBB4	HECTD2	ARL15	BACE2	CA7	CHMP1B	PCTP	XPO1	SLC30A7	DAG1	ARID5B	CYP4F3	PLCB1			
EREG	ANK3	ACBD5	PGRMC2	SPRY3	OXNAD1	SS18	ELL2	PDE3A	NETO2	NSFL1C	TWIF1	FREM2			
SLC35F5	RNF8	ERMP1	GNAQ	TEAD1	CNTN2	NR3C1	DENND6A	SRSF12	SMCHD1	PPP1R14C	LTPB2	SLC25A44			
FAM127A	PRND	ADAMT55	GNAS	STAM2	ARHGEF26	KLHL20	HNF4G	PDE4B	ZNF479	RIPPLY3	DDX39B	PTPRB			
SGCD	RAB39A	PAPD7	ZFP91	NR6A1	HERC4	COPG1	PRKCA	DIRC2	FAM160A1	VPS45	ERC1	SIK2			
NPAS4	RASSF8	TMEM245	GNAZ	UNKL	TAF11	BCLAF1	TNRC18	EMB	U2SURP	RPE	ADAMT53	ANKS1A			
ERG	MAN1A1	HGS	SH3GLB1	ZNF831	MAP4K3	SGMS1	XK	CTNND1	FN3KRP	ZNF644	USP31	KRT3			
SGK1	CNNM1	FGD2	HECTD1	GBP1	ZNF532	CCDC141	FOXO4L6	BTBD7	TEX2	IRAK1	CDADC1	USP6NL			
ORAI2	SEMA5A	RERE	GNB1	NUCKS1	NAP1L5	ZNF468	LRP1B	PPP1R15B	VANGL1	TMPPRSS11D	H6PD	MRS2			
ZNF808	ME1	KLHDC1	SULT4A1	SIDT1	ARL8B	SCAF8	CHMP3	CSTF3	PARP8	FLVCR1	FYCO1	RHOJ			
SH3BGR1	PLXNA4	ZFHX3	GNB2	TMEM63C	CEP192	HSD17B4	PRKAA2	PMAIP1	ANKRD11	PTCD2	HAUS3	RNF157			
MTHFR	ZMYND8	SEPSCE5	AGPS	AKIRIN2	HSPA12A	ZFR	ATF7IP	PIWIL1	SH3RF1	DOK6	PURB	ERVFRD-1			
ITSN1	BCO2	NUPR1	BHLHB9	PCMTD2	ENTPD1	ARFIP1	PRKAB2	FAM222B	KCNJ10	NYAP2	PRRG1	LCOR			
MVB12A	PRUNE2	TMEM115	LRR8C3B	PELI1	ARHGAP12	RHOBTB3	HIP1	FAM113A	CYP8B1	CRIP1	SHISA9	LMC8			
SNRNP48	BAZ1A	MOC51	TESK2	ZZZ3	ZNF518B	LCLAT1	FBXO21	TBRG1	TMEM55B	SHROOM3	ECM2	FMNL2			
MTAP	TMTC3	SLC16A6	COG4	CAPN6	SCARB2	ANKFY1	DOPEY1	NFATC2IP	C9orf72	INPP5A	RIMKL8	PUM1			
ESR1	ADAMTS6	THSD4	RUND1	MYH10	TNKS	USP33	CXADR	ARHGEF12	MLGL	RAP1GAP2	FBXO45	MBD6			
TMEM229A	CSRNP3	KDEL2R	GM2A	ZNF776	ASAP1	SYNJ2BP	SAMD4A	PKP1	RARG	RLF	DTNA	MBD6			
TANC2	SDC4	FOXO4	SPATA18	WIZ	SOX5	RAB11FIP2	PDZD2	TMEM30B	RAP2B	SLITRK6	OSBPL8	CSMD2			
KRT10															

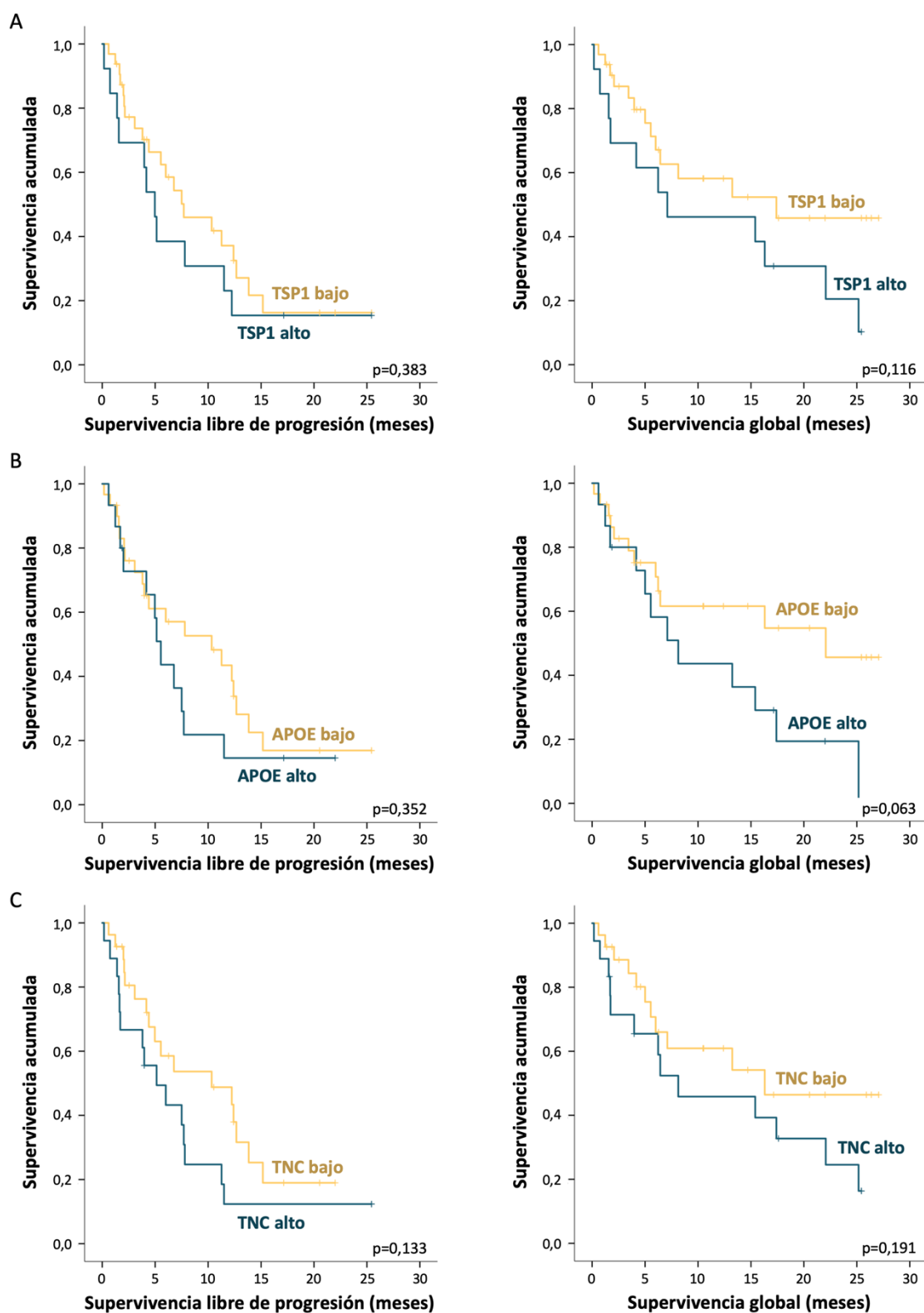
ANEXO 6. Análisis ontológico de los genes diana del miR-451a

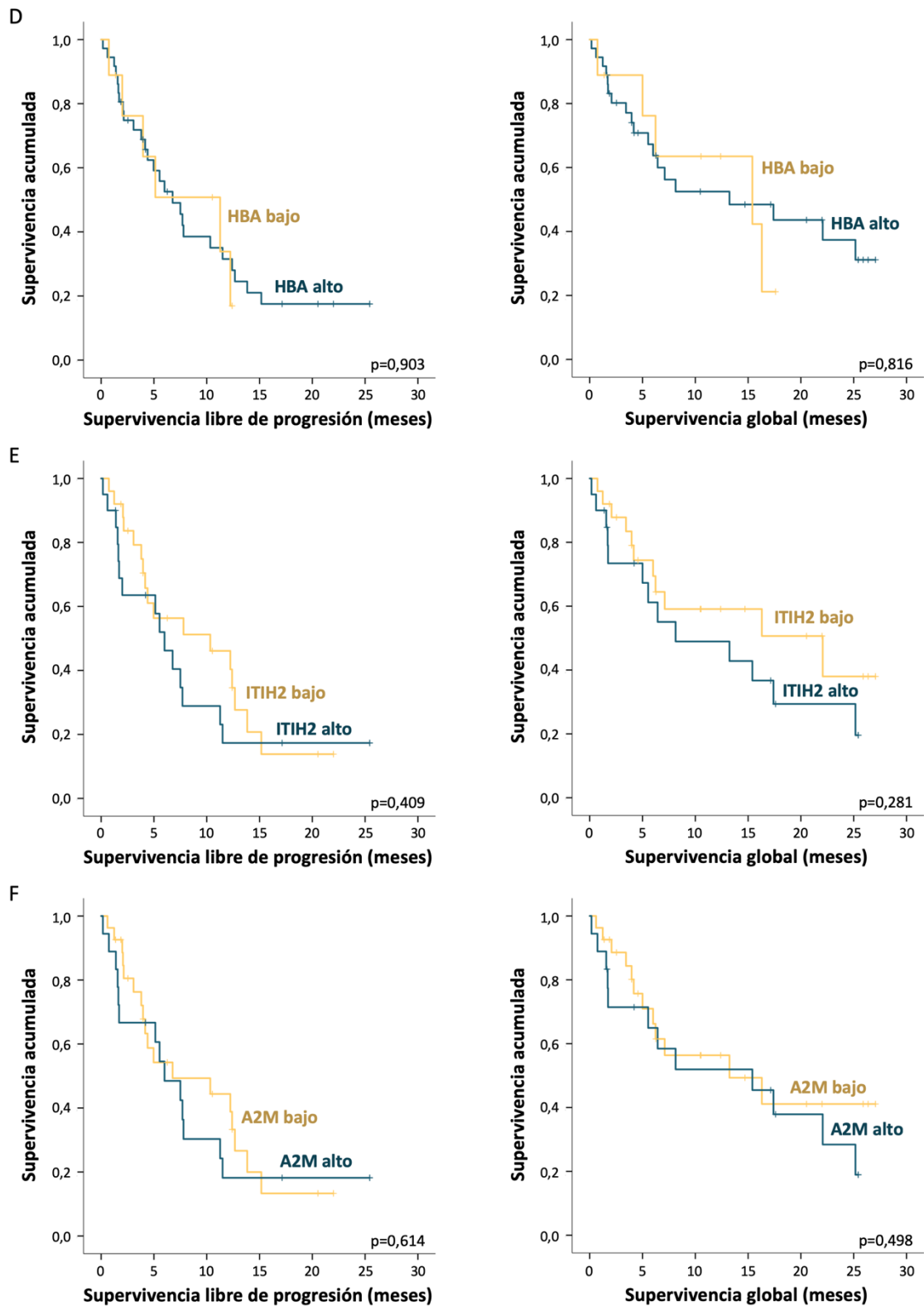
miR-451a			
Proceso Biológico	Nº de Genes	Genes	p valor
Regulación positiva de la transcripción mediada por los promotores de la ARN polimerasa II	15	<i>PPARA, KLF13, MAML1, TBX1, LPIN1, ZIC3, ATF2, MEOX2, OSR1, CDKN2B, POU3F2, MYOG, POU3F1, SMARCA2, BMP6</i>	0,024
Regulación negativa de la transcripción mediada por los promotores de la ARN polimerasa II	13	<i>PPARA, AEBP2, CCND1, BACH2, OSR1, NRARP, TFPC2L1, KLF11, CUX2, SMARCA2, TBX18, ATF2, BMP6</i>	0,012
Regulación negativa de la proliferación celular	11	<i>BAK1, ADARB1, CDKN2B, TSC1, EREG, KLF13, CDKN2D, KLF11, MYOG, SMARCA2, STK4</i>	0,001
Cascada MAPK	6	<i>EREG, PSMD11, MAP3K1, RASGEF1A, PSMB8, SPTB</i>	0,058
Regulación positiva de la apoptosis	6	<i>BAK1, ARHGEF3, PLEKHG2, KLF11, NSMAF, STK4</i>	0,092
Especificación del patrón antero-posterior	5	<i>CTNNBIP1, GRSF1, TBX1, CELSR1, ZIC3</i>	0,003
Ruta de señalización de Wnt, vía de polaridad celular planar	5	<i>VANG1, PSMD11, PRICKLE2, CELSR1, PSMB8</i>	0,006
Regulación de la estabilidad de los mARNs	5	<i>YWHAZ, PSMD11, YTHDF2, PSMB8, SAMD4B</i>	0,009
Regulación positiva de la fosforilación proteica	5	<i>WDFY2, CCND1, AKTIP, TBX1, STK4</i>	0,018
Arresto del ciclo celular	5	<i>CDKN2B, TSC1, CDKN2D, RPRM, CAB39</i>	0,026
Ruta celular	Nº de Genes	Genes	p valor
Degradación de valina, leucina e isoleucina	3	<i>ACADSB, OXCT1, PCCB</i>	0,045
Ruta de señalización de AMPK	4	<i>CCND1, TSC1, RAB14, CAB39</i>	0,059
Ciclo celular	4	<i>YWHAZ, CCND1, CDKN2B, CDKN2D</i>	0,060
Carcinogénesis viral	5	<i>BAK1, YWHAZ, CCND1, CDKN2B, ATF2</i>	0,061
Ruta de señalización de FoxO	4	<i>CCND1, CDKN2B, CDKN2D, STK4</i>	0,073
Ruta de señalización de Wnt	4	<i>CTNNBIP1, CCND1, VANG1, PRICKLE2</i>	0,078
Hepatitis B	4	<i>YWHAZ, CCND1, MAP3K1, ATF2</i>	0,0878

ANEXO 7. Análisis ontológico de los genes diana del miR-142-3p

miR-142-3p			
Proceso Biológico	Nº de Genes	Genes	p valor
Transcripción dependiente de ADN	130	MEF2C, MORF4L1, LMO3, MORF4L2, ZNF451, ZNF827, FOXO1, ZNF776, ZFP90...	0,005
Regulación de la transcripción dependiente de ADN	103	MEF2C, MORF4L1, LMO3, MORF4L2, ZNF827, FOXO4, ZNF776, RNF141, ZFP90...	0,006
Regulación positiva de la transcripción mediada por los promotores de la ARN pol II	82	MEF2C, BACH1, CCNT2, PPARA, E2F7, NR6A1, MORF4L2, PAX6, FOXO1, CASK...	<0,001
Regulación negativa de la transcripción mediada por los promotores de la ARN pol II	52	BACH1, MEF2C, PPARA, XPO1, BACH2, FGF9, E2F7, NR6A1, PAX6, FOXO1, ZEB2...	0,023
Transcripción mediada por los promotores de la ARN pol II	50	CCNT2, BACH1, MEF2C, BACH2, PAX6, FOXO4, ZIC3, TARDBP, FOXF2, CREB3L2...	<0,001
Regulación positiva de la transcripción dependiente de ADN	50	MEF2C, PPARA, RSF1, PAX6, FOXO1, LGR4, ZIC3, PICALM, ZFP90, FOXF2...	<0,001
Regulación positiva de la actividad GTPasa	43	FGD2, SNX18, ARHGEF26, ERBB4, FGF9, RP2, ASAP2, CYTH4, ASAP1, ITSN1...	0,018
Transporte proteico	39	RAB3A, RAB3B, CHMP3, RAB3D, CHMP5, RP2, CHMP7, PTPN23, VPS53, SNX3...	<0,001
Desarrollo de organismos multicelulares	38	WNT5A, TSHZ1, PAX6, EHF, SOX6, SPRY3, DIP2A, TNFRSF1B, FAT3, PIWIL1...	0,046
Regulación negativa de la proliferación celular	33	ERBB4, PTGS2, KMT2A, E2F7, ZEB1, FOXO4, TGFB2, FNTB, ALDH1A2, CUL5...	0,012
Regulación positiva de la expresión génica	30	MEF2C, KDM6A, FGF9, LRRC32, SLC6A4, PAX6, HFE, RDX, HSPA1B, SGMS1SOX11...	<0,001
Transporte	28	SLC5A3, MYO5A, MOBA, GABRB3, SLC20A2, GABRB2, XK, ACBD5, ACBD3...	0,033
Transporte intracelular de proteínas	27	SNX18, XPO1, CLTA, SEC24A, STX7, STAM2, AP3S2, CTTN, RUNC1, STX12...	<0,001
Respuesta a fármacos	25	XPO1, DRD1, PTGS2, SLC6A4, ABCA1, PFAS, TGFB2, SLC1A2, MTHFR, ACSL1...	0,035
Transducción de señales mediadas por GTPasas pequeñas	24	RAB2A, ARL2, RHOJ, RAB3A, ARL1, RAB3B, RAB3D, RAB39A, RAB40C, ITSN1...	0,006
Regulación positiva de la apoptosis	24	BMP4, FGD2, HMGB1, BCLAF1, ARHGEF2, RARG, ZAK, ERBB4, PTGS2, FOXO1...	0,051
Cascada MAPK	21	MEF2C, LAMTOR3, ERBB4, KL, FGF9, ARTN, FGF23, ITPKB, MARK3, PSMB5...	0,068
Transporte de vesículas retículo endoplasmático-Golgi	20	RAB2A, DYNC1L1, SEC24A, VAPB, LMF1, F9, LMAN1, WHAMM, RAB1A...	<0,001
Proceso catabólico de proteínas dependiente de ubiquitinación mediada por el proteasoma	20	TBL1XR1, NSFL1C, UBE2H, EDEM3, ARNTL, PSMB5, RNF126, C18ORF25...	0,012
Guía de axones	17	WNT5A, CDK5R1, KIF5B, KIF5A, NTN4, PAX6, ARTN, NRXN1, DPYSL2, TGFB2...	0,010
Migración celular	17	ERG, CCDC88A, FLT1, ERBB4, USP9Y, PEAK1, CDH2, SDC4, RAB1A, TGFB2...	0,021
Ruta celular	Nº de Genes	Genes	p valor
Rutas en cáncer	41	WNT5A, PTGS2, XIAP, FGF9, TFG, FOXO1, BCL2L1, TGFB2, RASGRP1, ITGAV...	<0,001
Endocitosis	26	CLTA, CHMP3, CHMP5, STAM2, CHMP7, CYTH4, ASAP2, ASAP1, HSPA1B, SNX3...	0,001
Ruta de señalización PI3K-Akt	26	OSMR, FGF9, BCL2L1, IL7R, ITGB8, ITGAV, RAC1, CREB3L2, PRKAA2, FGF2, GHR...	0,084
Proteoglicanos en cáncer	24	PRKCA, WNT5A, PIK3CG, ERBB4, ROCK2, CBL, ESR1, ITGA2, RDX, FZD3...	<0,001
Ruta de señalización MAPK	24	PRKCA, MEF2C, LAMTOR3, ZAK, TAOK1, FGF9, TGFB1, PPP3R1, FGF23...	0,010
Ruta de señalización del calcio	21	PRKCA, ORAI2, DRD1, PTGER3, ERBB4, LHCGR, PPP3R1, ITPKB, ITPR3, GRM5...	0,001
Regulación del citoesqueleto de actina	19	PIK3CG, ROCK2, FGF9, ITGA2, FGF23, RDX, ARHGEF12, IQGAP1, ITGB8, ITGAV...	0,036

ANEXO 8. Análisis de supervivencia según los niveles de cada proteína. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión (izquierda) y supervivencia global (derecha) en la cohorte de 45 pacientes de CPNM separados por tener niveles altos o bajos de la proteína TSP1 (A), APOE (B), TNC (C), HBA (D), ITIH2 (E) y A2M (F) en los exosomas circulantes de plasma.





ANEXO 9. Análisis de riesgo proporcional de Cox de SG con parámetros clínicos y el efecto de cada uno de los tres biomarcadores (GSN, miR-142-3p e ITIH2) por separado, incluyendo interacciones.

GSN		
Parámetro evaluado	Coeficiente de riesgo	p valor
Tipo Histológico Adenocarcinoma	0,115	0,002
Tipo Histológico Otros	0,694	0,609
Estadio IV	4,544	0,020
GSN	1,334	0,456
Adenocarcinoma + GSN	2,918	0,101
Otros + GSN	0,574	0,406
miR-142-3p		
Parámetro evaluado	Coeficiente de riesgo	p valor
Tipo Histológico Adenocarcinoma	0,135	0,001
Tipo Histológico Otros	0,8536	0,815
Estadio IV	4,053	0,023
miR-142-3p	1,230	0,538
Adenocarcinoma + miR-142-3p	1,763	0,290
Otros + miR-142-3p	52,311	0,035
ITIH2		
Parámetro evaluado	Coeficiente de riesgo	p valor
Tipo Histológico Adenocarcinoma	0,076	<0,001
Tipo Histológico Otros	0,390	0,200
Estadio IV	7,045	0,003
ITIH2	0,681	0,273
Hombre + ITIH2	3,578	0,014

ANEXO 10. Patente miARN endógeno**Acknowledgement of receipt**

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:

Submission number	300314148	
Application number	EP19382252.5	
File No. to be used for priority declarations	EP19382252	
Date of receipt	05 April 2019	
Your reference	903 780	
Applicant	Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz (FIBHULP)	
Country	ES	
Title	MIR-151A-3P AS AN UNIVERSAL ENDOGENOUS CONTROL FOR EXOSOME CARGO NORMALIZATION	
Documents submitted	package-data.xml application-body.xml OLF-ARCHIVE.zip\903 780 Text ready to file.zip SPECEPO-2.pdf\903 780 Claims.pdf (3 p.) SPECEPO-4.pdf\903 780 Figures.pdf (5 p.)	ep-request.xml ep-request.pdf (5 p.) SPECEPO-1.pdf\903 780 Description.pdf (23 p.) SPECEPO-3.pdf\903 780 Abstract.pdf (1 p.) f1002-1.pdf (3 p.)
Submitted by	CN=Gustavo Fuster 26814	
Method of submission	Online	
Date and time receipt generated	05 April 2019, 14:46:59 (CEST)	

ANEXO 11. Patente microARNs



Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201530997	
Fecha de recepción:	09 julio 2015, 15:14 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	P11783ES00	
Solicitante:	FUNDACION PARA LA INVESTIGACION BIOMEDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA PAZ	
Número de solicitantes:	4	
País:	ES	
Título:	Determinación de la metilación y niveles de un miARN en respuesta a un compuesto antitumoral basado en platino	
Documentos enviados:	Descripción.pdf (35 p.) Reivindicaciones.pdf (2 p.) Resumen.pdf (1 p.) Dibujos.pdf (5 p.) OLF-ARCHIVE.zip SEQLPDF.pdf (7 p.) SEQLTXT.TXT	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=NOMBRE ARIAS SANZ JUAN - NIF 00809834G,OU=500050022,OU=FNMT Clase 2 CA,O=FNMT,C=ES	
Fecha y hora de recepción:	09 julio 2015, 15:14 (CEST)	
Codificación del envío:	EA:9B:FE:A2:53:75:75:75:5D:08:0E:2A:1D:E0:F7:0E:F4:C7:3C:CD	

ANEXO 12. Artículos relacionados con la tesis

Integrative Modeling and Visualization of Exosomes

Julia Jiménez, Ludovic Autin, Inmaculada Ibáñez de Cáceres, David S. Goodsell

Information from proteomics, microscopy, and structural biology are integrated to create structural models of exosomes, small vesicles released from cells. Three visualization methods are employed and compared: 2D painting of a cross section using traditional media, manual creation of a cross section using the mesoscale 2.5D digital painting software cellPAINT, and generation of a 3D atomic model using the mesoscale modeling program cellPACK.

Introduction

Modeling of the molecular structure of cells is rapidly moving from an art into a science. A vast amount of data is being collected and made available: genomics and proteomics are providing accurate knowledge on all of the molecular players, structural biology is determining the form, function, and assembly of these molecules, and techniques of microscopy are revealing smaller and more detailed views of intact cellular systems. When combined with the rapid development of information and computing technology, the day when we can generate and visualize a molecular model of an entire cell is within reach.

As a step towards this ambitious goal, we have been developing methods for integrating diverse experimental data into comprehensible visualizations. We began with traditional scientific illustration to create visualizations for dissemination, outreach, and education, focusing on defined portions of living cells and their interactions with viruses (Goodsell, Franzen, et al. 2018). We have recently extended this work by developing cellPAINT, a digital painting program that assists in the creation of these types of subcellular landscape illustrations (Gardner et al. 2018). Building on this work, we are currently developing tools to create and visualize accurate 3D models of the molecular structure of cellular compartments and entire cells (Johnson et al. 2015).

As part of this work, we have used small, well-defined systems to test and apply new methods. Because the work is highly integrative, a wide variety of data must be gathered (or estimated) in order to generate a convincing model. Early illustrative work focused on well-studied systems, such as red blood cells and *Escherichia coli* (Goodsell 1992). For our 3D modeling work, we have used simpler systems, including HIV (Johnson et al. 2014) and mycoplasma bacteria (Goodsell, Autin, et al. 2018).

Exosomes provide an excellent test case for current mesoscale modeling methods. Sufficient proteomic, structural,

and ultrastructural data are available to define a convincing model, however, there are still grey areas in this knowledge that may benefit from mesoscale modeling. Given their growing role in many disease states, many illustrations of exosomes have been created, ranging from simple schematics to highly rendered editorial and advertising imagery (an internet search of “exosome” will yield hundreds of examples). However, to our knowledge, no detailed integrative models of exosomes have been generated that are consistent with available data on scale and composition. In this report, we present the results of an internship project on the integrative modeling and visualization of exosomes using three mesoscale techniques.

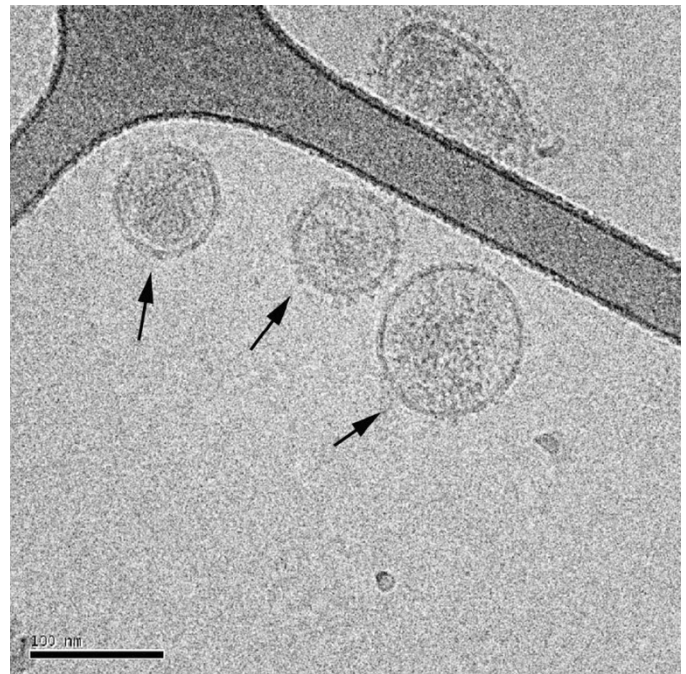


Figure 1 Cryo-electron micrograph of exosomes from prostate epithelial cells (prostasomes). Originally published in *Journal of Cell Biology* ©2013 (Raposo and Stoorvogel 2013).

Exosome Biology

Exosomes are nanovesicles that are released by most cell types into blood, urine, saliva, breast milk, and other bodily fluids (Raposo and Stoorvogel 2013). For much of the 30 years since their discovery, they have been described as garbage shuttles, but recent studies have revealed their role in cell communication and they are now seen as *information* shuttles (Huang-Doran et al. 2017). Exosomes are currently

the subject of intense study, since they are showing great promise for discovery of, for example, new approaches for cancer diagnosis and therapy (Barile and Vassalli 2017).

Exosomes have been reported to contain proteins, nucleic acids, lipids and metabolites, often enriched in specific molecules depending on the cell type and the environment surrounding the cells (Hessvik and Llorente 2018). For example, tumor-derived exosomes carry specific integrins to initiate the pre-metastatic niche (Hoshino et al. 2015) and induced pluripotent stem cells deliver ischemic-protective miRNAs to injured myocardium inside exosomes (Wang et al. 2015). Exosomes from different sources are often selectively loaded with a particular set of molecules, however, several components are shared between all of them. The most commonly detected proteins are used as exosome markers. These include CD9, CD81, CD63 and ALIX (PDCD6IP), as tabulated in the list of exosome markers at ExoCarta (http://exocarta.org/exosome_markers) (Keerthikumar et al. 2016).

Methodology

Exosome Structure and Components

Exosome Ultrastructure

Exosomes are surrounded by a single lipid bilayer membrane, with observed diameters ranging from 40 to 100 nanometers, and similar microvesicles may be up to ~10 times this large (Raposo and Stoorvogel 2013). In cryoelectron micrographs (Figure 1), they show a roughly spherical shape, with a dense array of proteins extending from the surface and a clumpy, concentrated collection of soluble components in the interior. Early micrographic work observed a cup shape, but this has more recently been attributed to dehydration of the sample during preparation.

Exosome Proteins

Many proteomics studies have been performed for exosomes under different conditions and disease states. We chose to model a generic exosome, without specific components of any disease or environmental condition, with 30 proteins that are identified across multiple studies (Appendix 1). This list includes 20 out of the 25 top proteins tabulated in the marker list at ExoCarta. Five of the top 25 proteins were judged to be potential artifacts: cytoskeletal proteins actin and clathrin, blood plasma proteins albumin and annexin A5, and annexin A2, which forms a complex with a protein not included in the list, S100A10/p11. Ten additional proteins were selected by manually compiling information from proteomic and review studies (Rashed et al. 2017, Kalra et al. 2016, Beach et al. 2014, Mathivanan et al. 2010, Thery et al. 2002).

For each protein, we chose the most complete structure from the list of Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org>) entries at UniProt (<https://www.uniprot.org>) and manually curated to determine the biological state of oligomerization. In several cases, a complete structure was not available in the PDB archive, so we used structures of individual domains and published reports to build an complete structure of the protein using the Python Molecular Viewer (Sanner 1999), as follows. TSG101 has a ubiquitin E2 variant domain followed by a coiled-coil region, however the oligomerization of this protein

remains unclear: some studies indicate that a single subunit participates in the ESCRT-I complex (Morita et al. 2007) while others point to a homotetramer (White et al. 2017). We chose to treat it as a monomer in the exosome. We manually connected available structures of the two domains of HSP70 based on (Stricher et al. 2013). The structure of CD81 was used to represent the three tetraspanins. Integrin was modeled from structures of the extracellular domain, single-pass transmembrane segment and short cytosolic tail based on (Lau et al. 2009). The transmembrane domains of HLA1 (human leukocyte antigen-1) and HLA2 were modeled based on the length of the chains annotated in UniProt. Glycosylation was added when indicated in UniProt using the Glycoprotein Builder (<http://glycam.org>) followed by manual repositioning to resolve clashes.

Exosome Nucleic Acids

Double-stranded DNA, mRNA, and miRNA have been detected in exosomes (Willms et al. 2018, Cai et al. 2016). The length of DNA fragments loaded into exosomes shows a wide range, from 35 to 17,000 base pairs, with an enrichment of the larger sizes from 6,000 to 17,000 base pairs. In addition, most studies find that these DNA fragments span all chromosomes. In the current model, we built a 10,000 base pair double-stranded DNA by repeating the structure of short oligonucleotide (PDB entry 6bna). Exosomal mRNA is typically small and heterogeneous, <200 nucleotides (Palanisamy et al. 2010), and was built using the single-stranded region of tmRNA (PDB entry 3iz4). Exosomes also contain miRNA, possibly in complex with argonaute proteins, which are currently the subject of intensive research because of their connections to cancer biology (Zhang et al. 2015). We used the structure of the pre-miR21 apical loop (PDB entry 5uzt) and the structure of argonaute2 bound to a guide RNA (PDB entry 4w5n).

Blood Plasma Proteins

Abundant information is available for blood plasma, presumably because it has historically been amenable for study. We included the 11 most abundant proteins (Appendix 2), with plasma concentration higher than 7 millimolar (Chan et al. 2004)—at this concentration, we would expect to have at least one copy present in the plasma volume represented in the model. In addition, we included miRNA in an argonaute2-miRNA complex, since there is some controversy about presence of miRNA in plasma (Gallo et al. 2012, Arroyo et al. 2011). Structures for blood plasma components were based on previous work with cellPAINT (Gardner et al. 2018) and low density lipoprotein structure was based on a cryo-electron study (entry EMD-5239 at <http://www.emdatabank.org>).

Concentrations

Information on absolute concentration of molecules in cells is typically the most difficult information to find in this type of integrative study. While a number of proteomics study have been done on exosomes, quantitative results are difficult to access and often contradictory. Furthermore, the quantification of exosomes is still an active field of research (Koritzinsky et al. 2017), and protein abundance is often variable among

originating cell types (Yoshioka et al. 2013). This variation is currently the topic of intense study, due to its potential use for identifying cancer markers (Li et al. 2017).

As a result, we were unable to find comprehensive information on exosome protein concentration. At early stages of the project, when we were developing a conceptual model for use in a painting, we took a qualitative approach, estimating concentrations using entries from Exocarta. As the project matured, we used a more quantitative two-step approach for the 2.5D and 3D models: (1) we started with the concentration as in the donor cell, and (2) modified individual concentrations based on published reports of enrichment in exosomes. This is described in more detail below.

Platelets are the major source of exosomes in plasma (Aatonen et al. 2014), so we based our model on a quantitative proteomic study of platelet (Burkhart et al. 2012). This study reports a copy number per platelet cell. We assumed a volume of 9.7 femtoliter for the platelet, calculated molar concentrations for soluble components and area-based densities for membrane-bound components, and calculated initial copy numbers for an exosome of 100 nanometer diameter (Appendix 1). These initial values were doubled to bring the overall concentration to values similar to the typical range of concentrations in eukaryotic cytoplasm, justified by the observation in the proteomics study that “absolute quantification based on spectral counting can suffer from errors up to 200 percent in individual cases” (Burkhart et al. 2012). These platelet concentrations were used in our model for transcription factors (EEF1A1 and EEF2), enzymes (enolase, pyruvate kinase, lactate dehydrogenase, GAPDH, etc.), two adapter proteins (YWHAZ and YWHAЕ), and G-protein.

We then applied an enrichment factor for proteins known to be enriched in exosomes: six-fold enrichment for HSPA8 (Faught et al. 2017), HSP90 at seven times more than HSPA8 (Clayton et al. 2005), 124-fold enrichment for tetraspanins CD9 and CD81 and seven-fold for CD63 (Escola et al. 1998). ESCRT-family proteins (PDCD6IP and TSG101) and rab7/rab5 proteins work with tetraspanins for intracellular trafficking and are commonly seen at high levels in proteomics (Tauro et al. 2012), so we applied an arbitrary enrichment factor of 20 for them. In addition, we collocated the tetraspanins and syntenin in the exosome models, since tetraspanins form microdomains that interact with syntenin (Latysheva et al. 2006). We were unable to find specific information about HLA2, so we set the concentration equal to that of HLA1, and enrichment values of eight for HLA2 and two for HLA1 (Escola et al. 1998). The concentration of argonaute2 was set equal to that of PDCD6IP, as both are implicated in miRNA packaging in exosomes (Iavello et al. 2016).

As noted in a recent review (Koritzinsky et al. 2017), the nucleic acid content of exosomes is highly heterogeneous. Concentrations of specific mRNA differ by orders of magnitude, from about 0.00001 to 10 molecules per vesicle. In the current work, the abundance of mRNA and miRNA was arbitrarily set to the average value of the soluble proteins and one DNA strand was included per vesicle. Similarly to previous work (Gardner et al. 2018), concentrations of blood

plasma components were based on proteomic studies (Chan et al. 2004).

These concentrations and membrane densities may be used directly for defining 3D models. In the 2.5D representations, the visualizations are typically partitioned into a foreground layer and two or more background layers. For these, we define a thickness of 10 nanometers for each layer, calculate the number of molecules that would fall within this volume, then distribute them within the layer.

Results

Structural Representation: Art and Science

One of our goals in this study is to explore and contrast different modes of creating mesoscale visualizations. Modeling approaches, which are often used in research applications, seek to incorporate as much of the available data as possible into the resultant model and visual representation, providing the ability to explore specific hypotheses about the relationship of structure with function. Illustrative approaches, on the other hand, are often used for dissemination, education and outreach, and may allow more room for artistic license, with the goal of creating a visual representation that is intuitive and comprehensible to a wide audience.

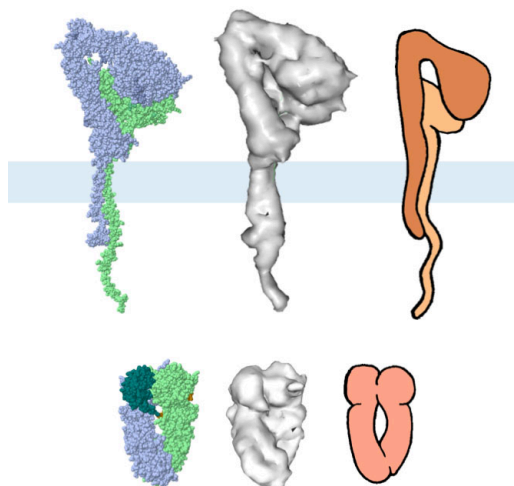


Figure 2 Development of protein representations. The atomic structure, surface representation, and hand-drawn image are shown for integrin (top) and HSP90 (bottom).

As a first step, we explored the representation of the components of exosomes and blood plasma, to define the players that will be used to build a scene (Figure 2). In each case, 3D models were built directly from atomic structures, and we generated images of full atomic models as well as smoothed models that are appropriate when depicting entire mesoscale scenes. Using these models, we searched for iconic views that reflect the shape and function of the molecules. These iconic views were manually chosen with several (occasionally conflicting) goals in mind. They may highlight the symmetry of a complex, making it easy to see how individual subunits interact (as in HSP90). They may highlight functional features of the molecule (as with binding clefts on the two domains of HSP70). The view may be constrained by

how it interacts with other features of the environment (as in the placement of all membrane-bound proteins approximately parallel to the plane of the page).

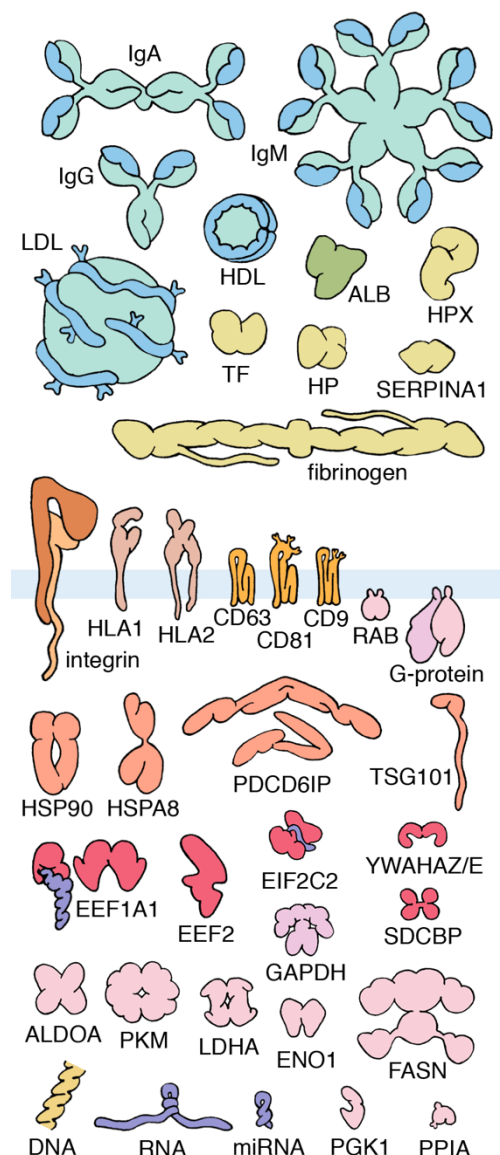


Figure 3 Proteins included in the visualizations. Blood plasma proteins are at the top, exosome membrane proteins at the center, and exosome lumen proteins at the bottom.

Once the viewing perspective was chosen, we based hand-drawn images on the surface representation of the structure and at proper scale (Figure 3). The aim of the visual representation of the proteins is simplify the structure to make it more comprehensible and recognizable when embedded in a complex scene. To this end, we incorporated several conventions into these drawings. Flat colors and outlines provide a familiar style similar to cartoons we see throughout the popular media. In several cases, additional gesture lines are added to relate the structures to features often used in diagrams, for example, lines were added to tetraspanins to show the multiple crossings of the chain across the membrane.

Hand-Rendered Illustration

We created a hand-rendered illustration (Figure 4) using our previously reported watercolor technique (Goodsell 2016). As in previous work, this illustration incorporates many modes of artistic license to improve the readability of the scene. For example, we use only standard views for molecule, so, for instance, all antibodies in the blood plasma are seen with their iconic Y-shape. The entire cross-sectional scene shows only a shallow slice through the environment, with sharp depth cueing to enhance spatial relationships and choosing a clipping plane that intersects the vesicles at their center, allowing intuitive understanding of the shape of the vesicle.

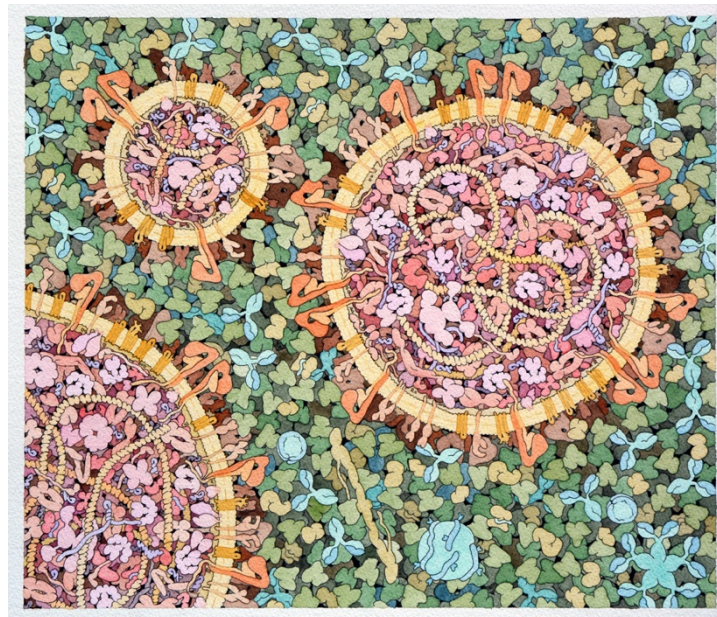


Figure 4 Watercolor illustration of three circulating exosomes (2018, Julia Jiménez). The exosome on the right has a diameter of 100 nanometers.

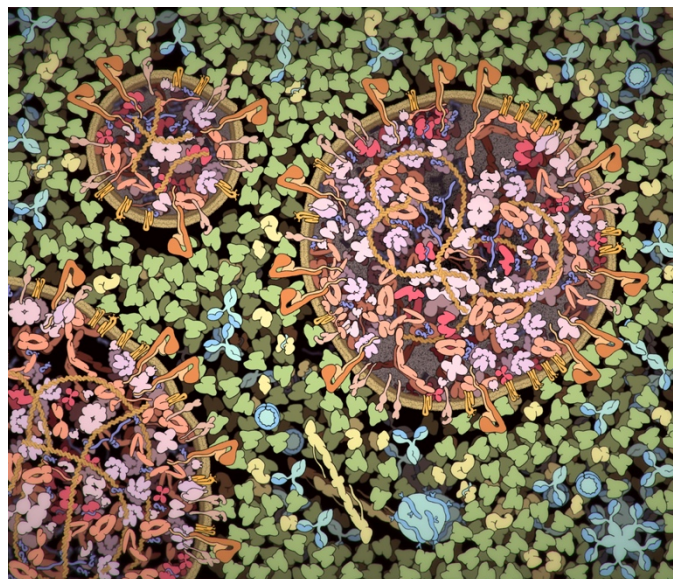


Figure 5 CellPAINT illustration of the scene depicted in Figure 4.

For the overall layout of the model, we chose to represent three circulating exosomes with diameters of 50, 100 and 140 nanometers. The 100 nanometer exosome, which is the size of a “typical” exosome, was placed in the most visually prominent position. The coloring scheme was chosen to enhance the different compartments, with warm colors for the exosome lumen to highlight the main characters in the scene.

CellPAINT 2.5D Digital Illustration

CellPAINT allows users to create similar illustrations using an interface akin to a paint program, providing a menu of molecules and membranes that may be added into a cross-sectional view of a cellular scene (Gardner et al. 2018). As with the painting, only a thin slice of the scene is visible, with a bright foreground layer and several background layers progressively obscured with distance-dependent depth cueing to black. In the current work, CellPAINT was modified to incorporate the molecular images from Figure 3 into the painting menu, allowing creation of scenes similar to the hand-drawn illustration.

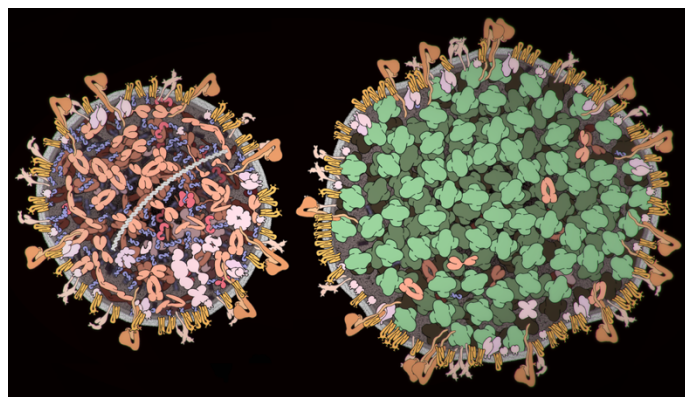


Figure 6 CellPAINT illustrations of a typical exosome (left) and a therapeutic exoCAT, with catalase molecules in green (right).

The great advantage of cellPAINT is that these digital scenes may be produced rapidly, sketching a variety of hypotheses. For example, Figure 5 shows a scene based on the watercolor painting, but generated in an hour or so. The two illustrations in Figure 6 show the results of a recent study using engineered exosomes for treatment of Parkinson’s disease (Haney et al. 2015). In the study, native exosomes from macrophages, which show a diameter of about 100 nanometers, were mixed with a solution of catalase and extruded several times through small pores in an Avanti Lipids Extruder. This causes breakage and reformation of slightly larger exosomes (155 nanometers diameter) loaded with catalase, and presumably also losing most of the native exosome interior contents in the process. These loaded “exoCAT” exosomes then provide an effective mode of delivery of the therapeutic catalase across the blood-brain barrier and to target neural and vascular cells. These illustrations required 5 to 10 minutes to produce and thus may be easily updated as new research results are obtained.

CellPACK 3D Model

Detailed 3D models were created using cellPACK (Figure 7) (Klein et al. 2018). CellPACK builds stochastic 3D models based on a recipe that defines structures, locations, and concentrations of molecular components randomly distributed within a scene composed of membrane-bounded compartments. The exosome recipe includes a spherical exosome membrane with diameter of 100 nanometers, and molecular parameters for the blood plasma, exosome membrane and exosome lumen based on the information included in Appendices 1 and 2.

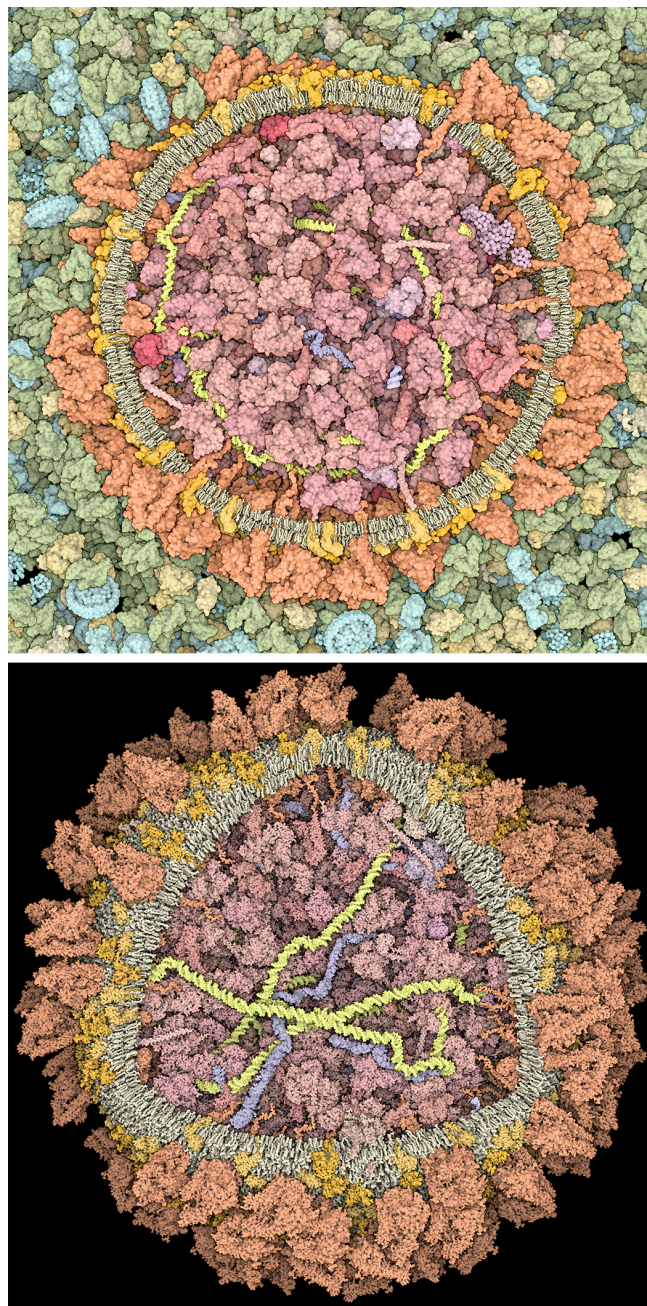


Figure 7 3D model of an exosome. (Top) Cross-section of the exosome surrounded by blood plasma, with proteins in smooth surfaces. (Bottom) Isolated exosome with one quadrant of membrane removed to reveal the cargo molecules inside.

Discussion

Art/Science Dialog

One of our goals of this work is to explore the dialog between art and science in our ongoing mesoscale modeling work. We are currently using three approaches: traditional illustrations of cross-sectional views, illustrations created digitally with cellPAINT, and visualization of full 3D models from cellPACK. Our insights from this study are best understood in the context of different communities of end users of the results, in research and in education.

In a research setting, this study followed a course that we have used in past studies on HIV and mycoplasmas. The artistic approaches, using watercolor and cellPAINT, are useful for gathering data, to help crystallize an integrated view and identify potential problems and gray areas. An artistic approach allows freedom to explore possibilities, sketching in approximations when needed and defining the areas that need exploration when moving to the rigor of detailed 3D modeling. The artistic approach also provides many insights that may be employed to aid interpretability when moving on to 3D visualizations. In turn, 3D models bring added levels of rigor to the artistic approaches. Methods like cellPAINT bridge the two approaches, allowing facile creation of new illustrations based on insights from the research with models.

In dissemination, outreach and education settings, we also have experienced a robust dialog between illustrative and modeling approaches. In general, the 2D and 2.5D illustrations are more comprehensible than visualizations of the 3D models, which may be due to the extensive use of artistic license to enhance both shape recognition of individual components and their spatial relationships in the scene. We

fully expect that 2D and 2.5D illustrations will be essential in the dissemination of our work on exosomes, for use in introductory material to give viewers the context of results. Then, once the general context is understood, more complex visualizations of 3D models may be presented to delve deeply into the science.

Accessibility of Mesoscale Methodology

This report presents the results of a proof-of-principle study, where methods were applied and evaluated by a single student (JJ) during a two-month summer internship at the Scripps Research Institute. Building on an informal foundation of artistic practice and based on her graduate research project focusing on experimental study of exosomes in cancer, she was able to research, plan, and render the watercolor illustration in this time, and to use the integrated information to create visualizations within the existing cellPAINT and cellPACK software suite. This underscores the growing accessibility of mesoscale techniques, both for creation of explanatory imagery and for detailed mesoscale modeling in research. We are currently expanding the functionality of both cellPACK and cellPAINT to make them more general and more accessible, and plan to do a more comprehensive user study to identify current needs of the research and education community, address these needs in our software development, and assess the utility of the resulting methods. The exosome version of cellPAINT, as well as a version tailored for creation of scenes with HIV-1, blood plasma, and a cell surface, is available at <http://cellpaint.scripps.edu>. More information on the entire cellPACK suite of programs is available at <http://ccsb.scripps.edu/cellpack>.

Please do not type in this space. JBC will remove this when it works on formatting the rest of this paper.

Acknowledgements

We thank Adam Gardner for his help with the cellPAINT development. This work was supported by PI18/0050 and PI15/00186, FEDER funds, "una manera de hacer Europa," and grant RO1 GM120604 from the US National Institutes of Health. This is manuscript 29804 from the Scripps Research Institute.

References

1. Aatonen, M. T., Ohman, T., Nyman, T. A., Laitinen, S., Gronholm, M., and Siljander, P. R. 2014. Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 3:1.
2. Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., Mitchell, P. S., Bennett, C. F., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Stirewalt, D. L., Tait, J. F., and Tewari, M. 2011. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:5003-8.
3. Barile, L., and Vassalli, G. 2017. Exosomes: Therapy delivery tools and biomarkers of diseases. *Pharmacol Ther* 174:63-78.
4. Beach, A., Zhang, H. G., Ratajczak, M. Z., and Kakar, S. S. 2014. Exosomes: an overview of biogenesis, composition and role in ovarian cancer. *J Ovarian Res* 7:14.
5. Burkhardt, J. M., Vaudel, M., Gambaryan, S., Radau, S., Walter, U., Martens, L., Geiger, J., Sickmann, A., and Zahedi, R. P. 2012. The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood* 120:e73-82.
6. Cai, J., Wu, G., Jose, P. A., and Zeng, C. 2016. Functional transferred DNA within extracellular vesicles. *Exp Cell Res* 349:179-183.
7. Chan, K. C., Lucas, D. A., Hise, D., Schaefer, C. F., Xiao, Z., Janini, G. M., Buetow, K. H., Issaq, H. J., Veenstra, T. D., and Conrads, T. P. 2004. Analysis of the human serum proteome. *Clinical Proteomics Journal* 1:101-225.
8. Clayton, A., Turkes, A., Navabi, H., Mason, M. D., and Tabi, Z. 2005. Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *J Cell Sci* 118:3631-8.
9. Escola, J. M., Kleijmeer, M. J., Stoorvogel, W., Griffith, J. M., Yoshie, O., and Geuze, H. J. 1998. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem* 273:20121-7.
10. Faught, E., Henrickson, L., and Vijayan, M. M. 2017. Plasma

- exosomes are enriched in Hsp70 and modulated by stress and cortisol in rainbow trout. *J Endocrinol* 232:237-246.
11. Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I., and Illei, G. G. 2012. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One* 7:e30679.
 12. Gardner, A., Autin, L., Barbaro, B., Olson, A. J., and Goodsell, D. S. 2018. CellPAINT: Interactive illustration of dynamic mesoscale cellular environments. *IEEE Computer Graphics Appl.* 38:51-66.
 13. Goodsell, D. S. 1992. A Look Inside the Living Cell. *American Scientist* 80:457-465.
 14. Goodsell, D. S. 2016. Cellular landscapes in watercolor. *J Biocommun* 40:22-26.
 15. Goodsell, D. S., Autin, L., and Olson, A. J. 2018. Lattice models of bacterial nucleoids. *J Phys Chem B* 122:5441-5447.
 16. Goodsell, D. S., Franzen, M. A., and Herman, T. 2018. From Atoms to Cells: Using Mesoscale Landscapes to Construct Visual Narratives. *J Mol Biol* 430:3954-3968.
 17. Haney, M. J., Klyachko, N. L., Zhao, Y., Gupta, R., Plotnikova, E. G., He, Z., Patel, T., Piroyan, A., Sokolsky, M., Kabanov, A. V., and Batrakova, E. V. 2015. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *J Control Release* 207:18-30.
 18. Hessvik, N. P., and Llorente, A. 2018. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci* 75:193-208.
 19. Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T. L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplop, N., Uryu, K., Pharmed, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A. E., Ararso, Y., Zhang, T., Zhang, H., Hernandez, J., Weiss, J. M., Dumont-Cole, V. D., Kramer, K., Wexler, L. H., Narendran, A., Schwartz, G. K., Healey, J. H., Sandstrom, P., Labori, K. J., Kure, E. H., Grandgenett, P. M., Hollingsworth, M. A., de Sousa, M., Kaur, S., Jain, M., Mallya, K., Batra, S. K., Jarnagin, W. R., Brady, M. S., Fodstad, O., Muller, V., Pantel, K., Minn, A. J., Bissell, M. J., Garcia, B. A., Kang, Y., Rajasekhar, V. K., Ghajar, C. M., Matei, I., Peinado, H., Bromberg, J., and Lyden, D. 2015. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527:329-35.
 20. Huang-Doran, I., Zhang, C. Y., and Vidal-Puig, A. 2017. Extracellular Vesicles: Novel Mediators of Cell Communication In Metabolic Disease. *Trends Endocrinol Metab* 28:3-18.
 21. Iavello, A., Frech, V. S., Gai, C., Deregibus, M. C., Quesenberry, P. J., and Camussi, G. 2016. Role of Alix in miRNA packaging during extracellular vesicle biogenesis. *Int J Mol Med* 37:958-66.
 22. Johnson, G. T., Autin, L., Al-Alusi, M., Goodsell, D. S., Sanner, M. F., and Olson, A. J. 2015. cellPACK: a virtual mesoscale to model and visualize structural systems biology. *Nat Methods* 12:85-91.
 23. Johnson, G. T., Goodsell, D. S., Autin, L., Forli, S., Sanner, M. F., and Olson, A. J. 2014. 3D molecular models of whole HIV-1 virions generated with cellPACK. *Faraday Discuss* 169:23-44.
 24. Kalra, H., Drummen, G. P. C., and Mathivanan, S. 2016. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *International Journal of Molecular Sciences* 17:170.
 25. Keerthikumar, S., Chisanga, D., Ariyaratne, D., Al Saffar, H., Anand, S., Zhao, K., Samuel, M., Pathan, M., Jois, M., Chilamkurti, N., Gangoda, L., and Mathivanan, S. 2016. ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J Mol Biol* 428:688-692.
 26. Klein, T., Autin, L., Kozlikova, B., Goodsell, D. S., Olson, A., Groller, M. E., and Viola, I. 2018. Instant Construction and Visualization of Crowded Biological Environments. *Ieee Transactions on Visualization and Computer Graphics* 24:862-872.
 27. Koritzinsky, E. H., Street, J. M., Star, R. A., and Yuen, P. S. 2017. Quantification of Exosomes. *J Cell Physiol* 232:1587-1590.
 28. Latysheva, N., Muratov, G., Rajesh, S., Padgett, M., Hotchin, N. A., Overduin, M., and Berditchevski, F. 2006. Syntenin-1 is a new component of tetraspanin-enriched microdomains: mechanisms and consequences of the interaction of syntenin-1 with CD63. *Mol Cell Biol* 26:7707-18.
 29. Lau, T. L., Kim, C., Ginsberg, M. H., and Ulmer, T. S. 2009. The structure of the integrin $\alpha 5 \beta 3$ transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling. *EMBO J* 28:1351-61.
 30. Li, A., Zhang, T., Zheng, M., Liu, Y., and Chen, Z. 2017. Exosomal proteins as potential markers of tumor diagnosis. *J Hematol Oncol* 10:175.
 31. Mathivanan, S., Ji, H., and Simpson, R. J. 2010. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics* 73:1907-1920.
 32. Morita, E., Sandrin, V., Alam, S. L., Eckert, D. M., Gygi, S. P., and Sundquist, W. I. 2007. Identification of human MVB12 proteins as ESCRT-I subunits that function in HIV budding. *Cell Host Microbe* 2:41-53.
 33. Palanisamy, V., Sharma, S., Deshpande, A., Zhou, H., Gimzewski, J., and Wong, D. T. 2010. Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes. *PLoS One* 5:e8577.
 34. Raposo, G., and Stoorvogel, W. 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 200:373-83.
 35. Rashed, M. H., Bayraktar, E., Helal, G. K., Abd-Ellah, M. F., Amero, P., Chavez-Reyes, A., and Rodriguez-Aguayo, C. 2017. Exosomes: From Garbage Bins to Promising Therapeutic Targets. *International Journal of Molecular Sciences* 18:E538.
 36. Sanner, Michel F. 1999. Python: A Programming Language for Software Integration and Development. *J. Mol. Graphics Mod.* 17:57-61.
 37. Stricher, F., Macri, C., Ruff, M., and Muller, S. 2013. HSPA8/HSC70 chaperone protein: structure, function, and chemical targeting. *Autophagy* 9:1937-54.
 38. Tauro, B. J., Greening, D. W., Mathias, R. A., Ji, H., Mathivanan, S., Scott, A. M., and Simpson, R. J. 2012. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods* 56:293-304.

39. Thery, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. 2002. Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nature Reviews Immunology* 2:569-579.
40. Wang, Y., Zhang, L., Li, Y., Chen, L., Wang, X., Guo, W., Zhang, X., Qin, G., He, S. H., Zimmerman, A., Liu, Y., Kim, I. M., Weintraub, N. L., and Tang, Y. 2015. Exosomes/microvesicles from induced pluripotent stem cells deliver cardioprotective miRNAs and prevent cardiomyocyte apoptosis in the ischemic myocardium. *Int J Cardiol* 192:61-9.
41. White, J. T., Toptygin, D., Cohen, R., Murphy, N., and Hilser, V. J. 2017. Structural Stability of the Coiled-Coil Domain of Tumor Susceptibility Gene (TSG)-101. *Biochemistry* 56:4646-4655.
42. Willms, E., Cabanas, C., Mager, I., Wood, M. J. A., and Vader, P. 2018. Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression. *Front Immunol* 9:738.
43. Yoshioka, Y., Konishi, Y., Kosaka, N., Katsuda, T., Kato, T., and Ochiya, T. 2013. Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types. *J Extracell Vesicles* 2:10.3402/jev.v2i0.20424.
44. Zhang, J., Li, S., Li, L., Li, M., Guo, C., Yao, J., and Mi, S. 2015. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 13:17-24.

Authors

Julia Jiménez is a predoctoral researcher in the Experimental Therapies and Biomarkers group at The Sanitary Research Institution IdiPAZ in Madrid and the Cancer Epigenetics group at University Hospital La Paz, Madrid. She has participated in the publication of 4 papers and 2 patents related to her research projects. She is performing her Ph.D. in molecular biosciences at the Autonomous University of Madrid. Contact her at jul.jimenez@estudiante.uam.es.

Ludovic Autin is a Staff Scientist with the Scripps Research Institute. He is Lead Developer of methods for mesoscale modeling, visualization, and augmented reality. He received his Ph.D. in molecular modeling from Paris 5 University. Contact him at autin@scripps.edu.

Inmaculada Ibáñez de Cáceres is the coordinator of the Experimental Therapies and Biomarkers group at The Sanitary Research Institution IdiPAZ in Madrid, and is the Director of the Cancer Epigenetics Group at University Hospital La Paz, Madrid. She has published more than 30 papers in the epigenetics field, is the main author of three patents based on biomarkers of clinical use, one of them already licensed and under exploitation, and has been serving as a Full Member representing her institution at the biomarkers platform from the European Infrastructure for Translational Medicine (EATRIS). Contact her at inma.ibanezca@salud.madrid.org.

David S. Goodsell (corresponding author) is an Associate Professor with the Scripps Research Institute and a Research Professor with Rutgers University. He currently divides his time between research in computational biology and science outreach. He received his Ph.D. in biochemistry from University of California, Los Angeles. Contact him at goodsell@scripps.edu.

Appendix 1. Exosome Proteins

Name	Description	UniProt ID	PDB ID	Number / Exosome (1)	Oligomeric State
<i>Lumen Proteins</i>					
HSP90	Heat Shock Protein	P07900 P08238	2cg9	86	Heterotetramer
HSPA8	Heat Shock Cognate 71 kD Protein	P11142	1dkz, 3hsc	30	Monomer
ENO1	Enolase	P06733	2psn	5	Homodimer
PKM	Pyruvate Kinase	P14618	1t5a	2	Homotetramer
LDHA	L-lactate Dehydrogenase	P00338	4ojn	2	Homotetramer
ALDOA	Fructose-bisphosphate Aldolase A	P04075	5ky6	3	Homotetramer
PGK1	Phosphoglycerate Kinase 1	P00558	5mlr	4	Monomer
FASN	Fatty Acid Synthase	P49327	2cf2	1	Homodimer
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase	P04406	4wnc	3	Homotetramer
PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase A	P62937	5noq	11	Monomer
PDCD6IP	ALIX	Q8WUM4	2oev	23	Monomer or Homodimer
TSG101	Tumor Susceptibility Gene 101 Protein	Q99816	3obs, 3iv1	8	Monomer or Homotetramer
EIF2C2	Protein Argonaute-2	Q9UKV8	4w5n	23	Monomer
SDCBP	Syntenin-1	O00560	1n99	1	Monomer or Homodimer
YWHAZ	14-3-3 Protein zeta/delta	P63104	1qja	10	Homodimer or Heterodimer
YWHAE	14-3-3 Protein epsilon	P62258	2br9	7	Homodimer or Heterodimer
EEF1A1	Elongation Factor 1- α 1	P68104	1dgl	1	Homodimer
EEF2	Elongation Factor 2	P13639	1n0u	1	Monomer
<i>Membrane-associated Proteins</i>					
CD63	CD63 Tetraspanin	P08962	(5tex)	59	Monomer
CD81	CD81 Tetraspanin	P60033	5tex	355	Monomer
CD9	CD9 Tetraspanin	P21926	(5tex)	281	Monomer
ITG	Integrin	P08648 P05556	4wk4, 2k9j, 1m8o	201	Heterodimer
RAB5A	Ras-related Protein	P20339	1n6h	18	Monomer

	Rab-5A				
RAB7A	Ras-related Protein Rab-7A	P51149	1vg8	54	Monomer
G-protein	Heterotrimeric G- protein	P10824 P62871 P63212	1gg2	72	Heterotrimer
HLAI	Human Leukocyte Antigen Class I	P03989 P61769	1hsa	7	Heterodimer
HLA2	Human Leukocyte Antigen Class II	P01903 P04229	1dlh	28	Heterodimer

(1) Values are those used for the 3D CellPACK model, estimated for an exosome with diameter of 100 nm.

Appendix 2. Blood Plasma Proteins

Name	Description	UniProt ID	PDB ID	Estimated Concentration (uM)	Oligomeric State
ALB	Serum Albumin	P02768	1e7i	640.	Monomer
TF	Serotransferrin	P02787	3v83,chain A	42.	Monomer
IgG	Immunoglobulin	P01857 P0DOX7/8	2ig2, 1fc2	53.-120.	Heterooligomer
IgA	Immunoglobulin	P01876 P0DOX7/8	(2ig2, 1fc2)	2.8-14.1	Heterooligomer
IgM	Immunoglobulin	P01871 P0DOX7/8	2rcj	0.60-2.6	Heterooligomer
Fibrinogen	Fibrinogen	P02671 P02675	1m1j	7.2	Heterotetramer
SERPINA1	Alpha-1- antitrypsin	P01009	1psi	39.	Monomer
HP	Haptoglobin	P00738	4x0l	3.8	Heterotetramer
HPX	Hemopexin	P02790	1qjs	65.	Monomer
HDL	High Density Lipoprotein	P02647	2msc, chains A,C	23.2	Heterooligomer
LDL	Low Density Lipoprotein	P04114	(EMD-5239)	1.-3.	Heterooligomer
EIF2C2	Protein Argonaute-2	Q9UKV8	4w5n	trace	Monomer

ANEXO 13. Artículos no relacionados con la tesis

Research Paper

DNA Methylation of miR-7 is a Mechanism Involved in Platinum Response through *MAFG* Overexpression in Cancer Cells

Olga Vera^{1, 2*}, Julia Jimenez^{1, 2*}, Olga Pernia^{1, 2}, Carlos Rodriguez-Antolin^{1, 2}, Carmen Rodriguez¹, Fatima Sanchez Cabo³, Javier Soto^{1, 2}, Rocio Rosas^{1, 2}, Sara Lopez-Magallon⁴, Isabel Esteban Rodriguez^{2, 5}, Ana Dopazo⁶, Federico Rojo⁷, Cristobal Belda⁸, Rafael Alvarez⁸, Jaime Valentin⁹, Javier Benitez^{10, 11}, Rosario Perona^{2, 11, 12}, Javier De Castro²✉, Inmaculada Ibanez de Caceres^{1, 2}✉

1. Cancer Epigenetics Laboratory, INGEMM, La Paz University Hospital, Madrid, Spain;
2. Biomarkers and Experimental Therapeutics in Cancer, IdiPAZ, Madrid, Spain;
3. Bioinformatics Unit, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Madrid, Spain;
4. Department of Obstetrics and Gynecology, La Paz University Hospital, Madrid, Spain;
5. Department of Pathology, La Paz University Hospital, Madrid, Spain;
6. Genomics Unit, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain;
7. Department of Pathology, University Hospital Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain;
8. Department of Oncology, HM Hospitales, Madrid, Spain;
9. Translational Research in pediatric oncology Hematopoietic transplantation and cell Therapy, IdiPAZ, Madrid, Spain;
10. Human Genetics Group, Spanish National Cancer Research Center (CNIO);
11. Spanish Network on Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain;
12. Department of Animal Models for Human Diseases, Institute for Biomedical Research CSIC/UAM, CIBER for Rare Diseases, Madrid, Spain.

* Both authors are first authors.

✉ Corresponding authors: Inmaculada Ibanez de Caceres and Javier de Castro, Cancer Epigenetics Laboratory, INGEMM, Biomarkers and Experimental Therapeutics in Cancer, IdiPAZ, Paseo de la Castellana 261, Madrid, 28046, Spain Phone 34-91-5854404 Fax 34-91-5854401 E-mail: inma.ibanezca@salud.madrid.org

© Ivyspring International Publisher. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). See <http://ivyspring.com/terms> for full terms and conditions.

Received: 2017.03.16; Accepted: 2017.07.04; Published: 2017.09.22

Abstract

One of the major limitations associated with platinum use is the resistance that almost invariably develops in different tumor types. In the current study, we sought to identify epigenetically regulated microRNAs as novel biomarkers of platinum resistance in lung and ovarian cancers, the ones with highest ratios of associated chemo-resistance.

Methods: We combined transcriptomic data from microRNA and mRNA under the influence of an epigenetic reactivation treatment in a panel of four paired cisplatin -sensitive and -resistant cell lines, followed by real-time expression and epigenetic validations for accurate candidate selection in 19 human cancer cell lines. To identify specific candidate genes under miRNA regulation, we assembled “in silico” miRNAs and mRNAs sequences by using ten different algorithms followed by qRT-PCR validation. Functional assays of site-directed mutagenesis and luciferase activity, miRNAs precursor overexpression, silencing by antago-miR and cell viability were performed to confirm their specificity in gene regulation. Results were further explored in 187 primary samples obtained from ovarian tumors and controls.

Results: We identified 4 candidates, miR-7, miR-132, miR-335 and miR-148a, which deregulation seems to be a common event in the development of resistance to cisplatin in both tumor types. miR-7 presented specific methylation in resistant cell lines, and was associated with poorer prognosis in ovarian cancer patients. Our experimental results support the direct regulation of *MAFG* through miR-7 and their involvement in the development of CDDP resistance in human tumor cells.

Conclusion: The basal methylation status of miR-7 before treatment may be a potential clinical epigenetic biomarker, predictor of the chemotherapy outcome to CDDP in ovarian cancer patients. To the best of our knowledge, this is the first report linking the regulation of *MAFG* by miRNA-7 and its role in chemotherapy response to CDDP. Furthermore, this data highlights the possible role of *MAFG* as a novel therapeutic target for platinum resistant tumors.

Key words: miR-7, *MAFG*, DNA methylation, Cisplatin-resistance, cancer.

Introduction

Platinum-based chemotherapy, in combination with other anticancer drugs, is one of the most potent and widely used chemotherapeutic treatments. Platinum analogues display clinical activity against a broad spectrum of malignancies, including testis, ovary, head, neck and lung cancers. However, one of the major limitations of the use of platinum-based chemotherapy is that the disease almost invariably progresses to a platinum-resistant state, primarily in lung and ovarian cancers [1, 2]. In fact, it is common to find many studies enclosing both pathologies from researchers working in the field of drug-resistance [3-6]. A number of events have been proposed to explain the phenomenon of cisplatin resistance in cancer, including alterations in the epigenetic regulatory machinery, such as the silencing of gene expression through promoter methylation [7, 8]. This process has been also reported in the silencing of regulatory regions of tumor suppressor microRNAs (miRNAs), thereby increasing the expression of their target genes in cancer [9]. In fact, miRNAs are the most recently discovered mechanism of epigenetic inheritance that acting with messenger RNA can alter gene expression status [10]. miRNAs were first related to cancer in 2002; those that were downregulated were defined as tumor suppressor miRNAs, such as the miR-15a/16-1 cluster in chronic lymphocytic leukemia [11]. The gain or loss of these miRNAs can increase or decrease the activity of several signaling pathways in cancer cells [12]. For instance, a number of miRNAs are regulated by c-MYC, an oncogene that codes for a transcription factor involved in cancer and regulates processes such as cell cycle progression (miR-17, let-7), inhibition of apoptosis (miR-19a, miR-26a) and metastasis (miR-9) [13]. Moreover, miRNAs can regulate the action of DNA-methyltransferases, which has been associated with tumorigenesis in mice injected with lung cancer cell lines [14]. DNA methylation is one of the epigenetic regulators of miRNA expression and therefore, might be also responsible for the development of resistance to chemotherapy. The silencing though DNA methylation can be reverted by combination of demethylating drugs and histone deacetylase (HDAC) inhibitors such as 5 Aza-2deoxycytidine (5Aza-dC) and Trichostatine A (TSA). Both drugs act in synergy by depleting methyltransferase activity [15] and reversing the formation of transcriptionally repressive chromatin structure [16]. Strategy previously described in many tumor types [17, 18]. However, our understanding of the regulation of miRNA expression and their role in

chemoresistance is still poor [19]. In this study, we aimed to gain insight into the role of miRNA epigenetic regulation by DNA methylation over the response to cisplatin in cancer. We compared the global miRNA and mRNA expression profiles between sensitive/resistant-paired cancer cell lines under reactivation treatment and we analyzed whether those changes were due to DNA hypermethylation by further functional validation in different cell lines and cohorts of ovarian cancer patients.

Materials and Methods

Cell culture, treatments and viability to CDDP

Fifteen human cancer cell lines were purchased from ATCC (Manassas, VA) or ECACC (Sigma-Aldrich, Spain) and cultured as recommended. The CDDP-resistant variants A2780R and OVCAR3R were selected after a final exposure to 0.5 and 0.05 $\mu\text{g/ml}$ cisplatin, respectively (Farma Ferrer, Spain), as previously described for H23R and H460R variants [20]. The additional 11 human cell lines, PC-3, LNCAP, H727, HT29, A549, BT474, LoVo, IMIM-PC-2, SKOV3, SW780 and IMR90, were used for further validations. For viability assays cells were treated with increasing doses of CDDP as described [21]. The epigenetic reactivation drugs 5Aza-2deoxycytidine (5Aza-dC) and trichostatin A (TSA) (Sigma-Aldrich, Spain) were used at 5 μM and at 300nM respectively as described [22]. Cell authentication and treatments are described in Supplementary Material and Methods and Supplementary Table 1.

Clinical sample and data collection

Formalin-Fixed Paraffin embedded (FFPE) and fresh-frozen ovarian cancer samples were collected from untreated patients and associated clinical data were obtained from Hospital Parc de Salut Mar (83 patients) and Biobank of IDIS-CHUS-HULP (55 patients) representing the most frequent ovarian cancer subtypes; all the patients underwent chemotherapy treatment after sample collection. Seven patients were also selected from stage III/IV patients from Hospital Madrid Clara Campal with a platinum treatment response classified as refractory or resistant. In addition, 22 high-grade serous carcinoma (HGSOC), were obtained from the National Cancer Research Centre (CNIO) biobank in collaboration with Dr. J. Benitez, from a previously reported cohort of patients [23]. We also collected 10

normal ovarian samples from patients who had undergone a sex reassignment surgery or tubal ligation and 10 peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) to discard genomic imprinting. Follow-up was conducted according to the criteria of the medical oncology divisions from each institution. All the samples were processed following the standard operating procedures with the appropriate approval of the Human Research Ethics Committees at each contributing center, including informed consent within the context of research. Clinical, pathological and therapeutic data were recorded by an independent observer, and a blind statistical analysis was performed on these data.

RNA extraction and miRNA/mRNA array preprocessing

RNA extraction, assessment of quality and hybridization into Agilent platforms for microRNA and mRNA microarrays and data normalization is deeply described in Supplementary Materials and Methods. The criteria used for filtering the miRNA/mRNA data were according to the packages recommended by Agilent, and were analyzed by two independent bioinformaticians. miRNA/mRNA experiments had an average expression over the 20th percentile of all average expressions and changed across the different conditions (i.e. with a coefficient of variation [CV] >5% across all samples). Global data were combined to identify those miRNAs, with inhibited expression after cisplatin treatment that were re-expressed after epigenetic reactivation, together with those genes that have *in silico* mRNA complementary sequences and opposite expression. Genes were considered as targets if selected with at least one of the 10 methods described by Alexiou *et al* [24]. For the inverse expression profiles, only those pairs (miRNA, gene) with a negative Spearman correlation coefficient and a p-value for this correlation <0.1 were considered as potential targets. The databases GeneCard (<http://www.genecards.org>), miRBase (www.mirbase.org), mirwalk (www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk) and Web gestalt (www.bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt) were used for bioinformatics analysis [25-27]. (GEO reference: GSE84201).

RNA isolation and quantitative RT-PCR

Total RNA was retrotranscribed and quantitative RT-PCR analysis were performed as previously described [20, 22]. Samples were analyzed in triplicate using the HT7900Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA), and relative expression levels were calculated according to the comparative threshold cycle method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) using RNU48 or RNU6B as an

endogenous control miRNAs and GADPH or β -actin as an endogenous control genes. Primers and probes for expression analysis were purchased from Applied Biosystems. miRNAs probes are detailed in Supplementary Table 2. Probes for gene expression are as follows: MAFG: Hs 01034678_g1; ELK1: Hs 00901847_m1; MAPKAP1: Hs 01118091_m1; ABCA1: Hs 01059118_m1; GADPH: Hs03929097_g1; β -actin: Hs99999903_m1. Data are presented as the “change of expression in number of times” (Log10-RQ) and the error bars are expressed as the maximum estimate (RQmax) and the minimum estimate (RQmin) expression levels, representing the standard deviation of the average expression level RQ. miRNAs from human HEK-293T cell line were isolated using the miRNeasy kit (Quiagen, USA) and miR-7 expression analysis was carried out as described before, using RNU48 as endogenous control and the experimental groups transfected with 3'-UTR plasmid control and miR-NC as calibrators.

Site-directed mutagenesis assay

The full length MAFG-3'-UTR sequence (NM_002359.3 OriGene, USA) was used as a template to generate the mutants MAFG 3'UTR. Two different regions were identified by more than six bioinformatical algorithms as seed region of miR-7 binding site. Seven nucleotides within each seed region were mutated. Site-directed mutagenesis was carried out with QuikChange lightning site-directed mutagenesis kit (Stratagene, USA) according to the manufacturer's instructions. The presence of both mutated seed regions and the integrity of the remaining MAFG 3'UTR sequence of all constructs were validated by Sanger sequencing. The primers designed to introduce mutations were for Region2: Fw-5'-caagtaaaccatgatata**tagtgc**tacttcacctaactttgcc-3'; Rv-5'-ggcaaagttaaggtggaag**tagc**actatatacatggtttacttg-3'; and for Region8: Fw-5'-ggccaagcgttcctggcc**agtgc**tactctggcctcagctttgttc-3', Rv-5'-gaacaaagctgaggcc**agatagc**actggccagggaacgcttgcc-3'.

Cell Transfection and lentiviral transduction

miR-7 overexpression and silencing: Cell lines were seeded at 500,000 cells/p60 plate, then transfected with 40 or 50 nM of miR-7 precursor, anti-miR-7 or negative controls (AM17100, AM 17110, AM10047 and AM17010 Ambion, USA) and using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's protocol.

Luciferase assay

HEK-293T cells were transfected with MAFG-3'-UTR, MAFG-3'-mutated-UTR, ABCA1-3'-UTR or ELK-1-3'-UTR plasmids (OriGene, USA), and PremiR-hsa-miR-7 or Negative Control as described

above. Luminiscence was assayed 24 hours later using the Kit Renilla Luciferase Assay System (Promega, USA), according to the manufacturer's instructions. Results were normalized to the Renilla luminiscence from the same vector and shown as the ratio between the various treatments and cells transfected with control vector.

cDNA plasmids transfection

A Myc-DDK-tagged ORF clone of *MAFG*, *ELK-1* or *ABCA1* and the negative control pCMV6 were used for in transient transfection (OriGene, USA). H23 and A2780 cells were plated onto 60-mm dishes at 6x10⁵ cells/dish and transfected with a negative control, *MAFG*, *ELK-1* or *ABCA1* vectors (IDs: RC221486; RC208921 and RC221861) using jet-PEI DNA Transfection Reagent (PolyPlus Transfection, USA). For stable overexpression, lentiviruses carrying *ELK-1* cDNA (Applied Biological Materials, Canada) were obtained by cotransfecting 15 µg of the specific lentiviral vector (pGIPZ-nonsilencing or pLenti-GIII-CMV-h*ELK-1*-GFP-2A-Puro) and 5 µg of each packaging vector (pCD-NL-BH and pMD2-VSV-G) in 10 million HEK 293T cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA). Supernatants were taken at 48 hours posttransfection. A2780S cells were plated onto 60-mm dishes at 1x10⁵ cells/dish and transduced with supernatant carrying nonsilencing or *ELK-1* lentivirus, and polybrene was added (5 µg/ml).

Transfection efficacy was measured by qRT-PCR, using the sensitive cell line transfected with the negative control as a calibrator. Two independent experiments were performed in quadruplicate.

Epigenetic validation: CpG island identification, DNA extraction, bisulfite modification, bisulfite sequencing and methylation-specific PCR

The occurrence of CpG islands (CGIs) encompassing microRNA genes or being located nearby as well as the identification of repetitive elements were assessed using various programs for CGI-revealing, listed and described in Supplementary Material and Methods. The possible gene in which the miRNA was encoded was also analyzed, searching for the presence of 5' CGIs located in the transcriptional site. The DNA from a total of 151 samples, including tumors, controls and cultured cell was isolated, bisulfite modified and used for BS, as previously described [22]. Primers design, PCR and electrophoresis conditions are detailed in Supplementary Material and Methods. Primers are listed in Supplementary Table 3. For BS, we prefer

direct sequencing, to subcloning of a mixed population of alleles to avoid potential cloning efficiency bias [28] and artifact [29].

Western blot analysis

Cell lines were cultured at a density of 600,000 cells per 60-mm plate, shifted into medium containing 10% fetal bovine serum for 24 h and 72 h. Twenty micrograms (20 µg) of whole-cell extracts were subjected to Western blot, performed as previously described [30]. The primary antibodies employed were the c-Myc-A14 (Santa Cruz, USA) and β-tubulin (Sigma, Spain) antibodies.

Statistical analysis

For the identification of differentially expressed miRNAs and genes from the microarray data, we used linear models [31] as implemented in the Limma Bioconductor package. The fixed effects were the origin of the tissue (lung/ovarian), the cell line (H460, H23, OVCAR3, A2780) and the condition (sensitive, resistant, resistant treated). The replicate is the random effect. To identify the downregulated miRNAs in resistant cells and their opposite expressed target genes, we performed the following contrasts for all the tissues (lung and ovarian) or for each tissue origin (lung or ovarian): resistant vs. sensitive and resistant-treated vs. resistant.

We then selected the candidates that fulfill the following conditions in at least 2 of the 4 cell lines interrogated: Log₂(R/S) <0 AND Log₂ (RT/R) >0; RvsS or RTvsR statistically different p<0.05. As a statistical method we used the unpaired T-test algorithm with Benjamini Hochberg (BH) as the FDR correction method for multiple testing corrections with statistical significance of p<0.1 in the miRNA approach and p<0.05 in the gene approach as an adjusted p-value.

Patient's clinical characteristics were described for the complete series with mean and standard deviation values or relative frequencies. The data were stratified for patients carrying methylated or unmethylated DNA, and their distributions compared with the chi-squared test or Fisher's exact test for qualitative variables, and Student's t test or the Wilcoxon-Mann-Whitney test (non-normal distribution) for quantitative variables. Overall survival and Progression free survival (PFS) were estimated according to the Kaplan-Meier method and compared between groups by means of the log-rank test. All the p-values were two-sided, and the type I error was set at 5 percent. Statistical analyses were performed using Stata 10 software.

Results

Establishment of ovarian human cancer cell lines resistant to CDDP

We have established 2 ovarian cancer cell lines resistant to CDDP, A2780-R and OVCAR3-R, that showed approximately three times more drug resistance than the paired parental cell line A2780 and OVCAR3 (3.00 and 2.96 Resistant-Index (RI); $p < 0.001$) and a similar CDDP RI to H23R and H460R NSCLC cancer cells, that we established previously [20], (3.35 and 2.50 respectively; $p < 0.001$) (Figure 2A and Supplementary Figure 1A).

Identification of candidate miRNAs

As a first step to identify candidate miRNAs under epigenetic regulation and involved in the CDDP response, we searched for miRNAs showing a decrease of the expression in R versus S cells and a recovered expression after epigenetic reactivation-treated (RT) versus R cells. First, 87 miRNAs identified on the expression arrays showed a significant expression change ($p < 0.05$) in at least one of the following conditions: $R < S$ or $RT > R$; while 28 changed their expression with a p -value $\text{adj} < 0.1$ simultaneously in both situations. By analyzing the concurrence of CGIs with the characteristics described by Takai and Jones [32], candidates were reduced to 10 encompassing microRNA genes or being located nearby (less than 2000 bp 5'-upstream), together with the analysis of the presence of CGIs in the gene promoter region in which the miRNA is encoded. After a pair-base-complementarity analysis *in silico* between miRNA and the candidate target genes that showed an opposite expression profiles (Supplementary Database Information); we made a functional web-based enrichment analysis with the selected genes by GOTM. This approach identified 7 miRNAs which potential target genes were involved in tumor progression: miR-7, miR-132, miR-335, miR-148a, miR-10a, miR-124 and miR-9 (Figure 1 and Supplementary Table 4). Mature miR-7 is generated from three different miRNA precursors in the human genome, miR-7-1, miR-7-2, and miR-7-3; we assumed expression changes were tightly associated to miR-7-3 (hereafter called miR-7) as no changes were identified on miR-7-1 and miR-7-2 probes represented in the array and it is the only precursor that presents two CGIs surrounding its genome location. We also found that some of the miRNAs showing the strongest upregulation were located at the C19MC cluster, previously linked with carcinogenesis [33]. It presents a CGI located about 17kb from the first miRNA [34] that was included to analyze its potential epigenetic regulation in drug resistance.

miRNA-7 as potential chemoresistance candidate under epigenetic regulation

Firstly, we validated the expression profile of the 3 experimental conditions (S, R and RT) by qRT-PCR assay confirming the results from the microarray analysis for all 7 miRNAs in at least one of the four cell lines analyzed. Three of the seven miRNAs showed changes in their expression according to the microarray data in A2780 cells: miR-7, miR-132 and miR-10a, whereas no significant changes in expression between S and R cells were found for miR-124 (Figure 2B). The cell line OVCAR3 showed changes in miR-132 and -124, according to the array data. Although both increased expression in RT, no differences between S and R were reported (Figure 2C). For the lung cancer model, 6 miRNAs in H23 cells and 2 miRNAs in H460 cells miRNAs were fully validated (Supplementary figure 1B-C).

miR-132, miR-148a miR-335, and miR-7, were validated in at least 2 cell lines and further selected for epigenetic validation by bisulfite sequencing (BS), together with the C19MC cluster's CGI. This cluster is on the long arm of chromosome 19 and has a CGI of 2255 bp from which we analyzed 394 bp that comprises the area with the highest density of CG positions in H23, H460, A2780 and OVCAR3 cell lines. We also tested DNA from normal tissues from lung (LC), ovary (OC) and PMBCs to discard imprinting. All analyzed CpG positions were densely methylated (Supplementary Figure 2A), confirming a possible role in embryonic development as described [35, 36], but excluding a relation between acquisition of DNA hypermethylation and drug-response. Referred to miR-132, the area analyzed was 866 bp in length, at a CGI comprising -1847/+667bp at the short arm of chromosome 17. miR-148a is located on the short arm of chromosome 7, with a nearby CGI of 1663, located 137 bp upstream from the miRNA. A 560 bp area of the CGI was analyzed. No methylation was found for both miRNAs either on the tumor cell lines or controls samples analyzed (Supplementary Figure 2B and 2C). miR-335 is located on the long arm of chromosome 7, on the second intron of the MEST002 gene transcript. A 1123 bp CGI is located in the promoter region of this transcript. We analyzed a fragment of 528 bp initially in the H23S/R, H460S/R cells and LC. The results showed methylation only in H460S/R subtypes. We extended the analysis to the additional cell lines LoVo, OVCAR3 and PC-3, and control samples, and no methylation was found in any of them (Supplementary Figure 2D). Pairs of primers are listed in Supplementary Table 3.

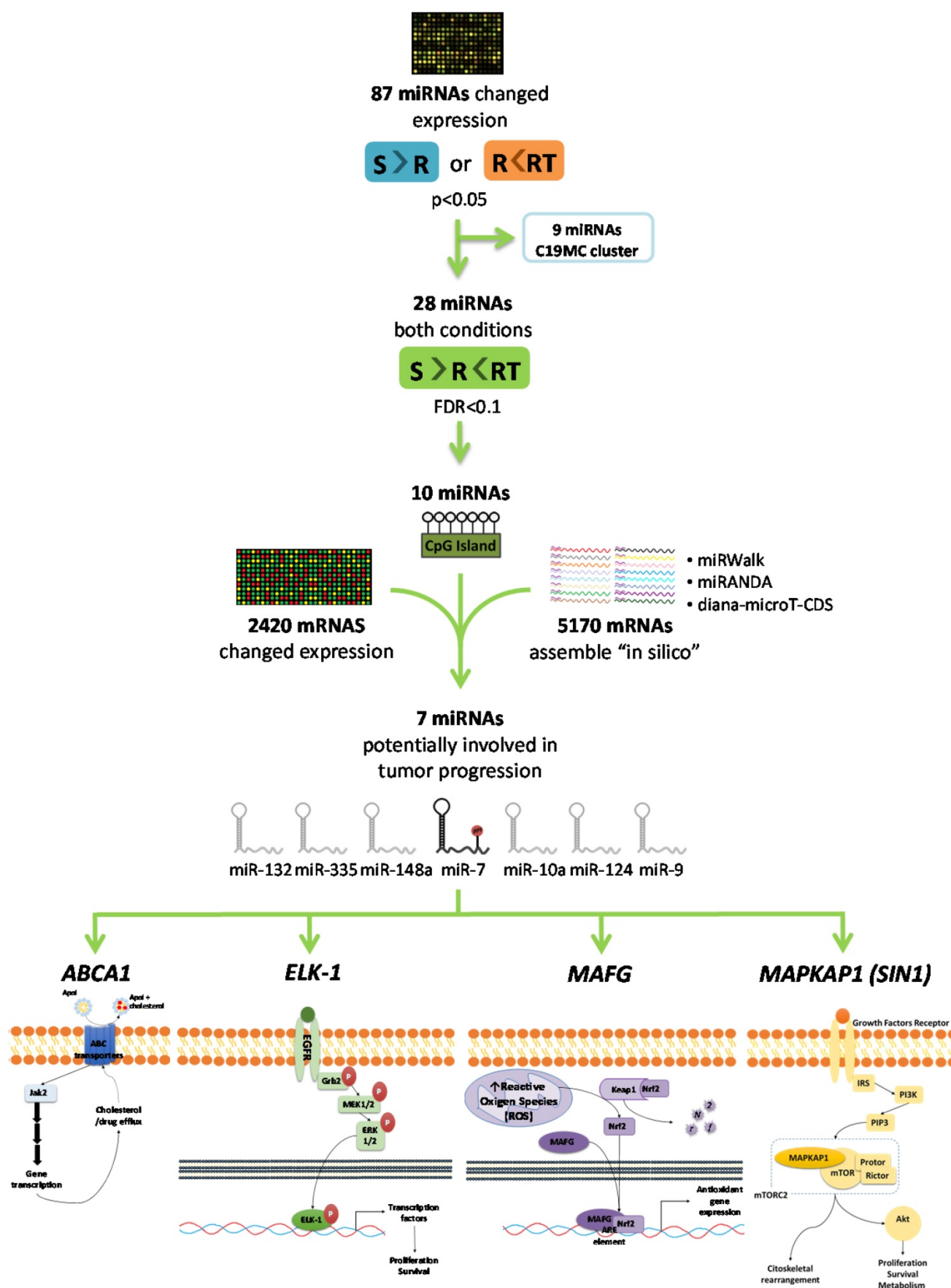


Figure 1. Selection of candidate miRNAs under epigenetic regulation and candidate target genes. The flowchart indicates the steps and criteria used for the selection of the final 7 candidate miRNAs under epigenetic regulation and the final 4 candidate genes under possible regulation of miR-7.

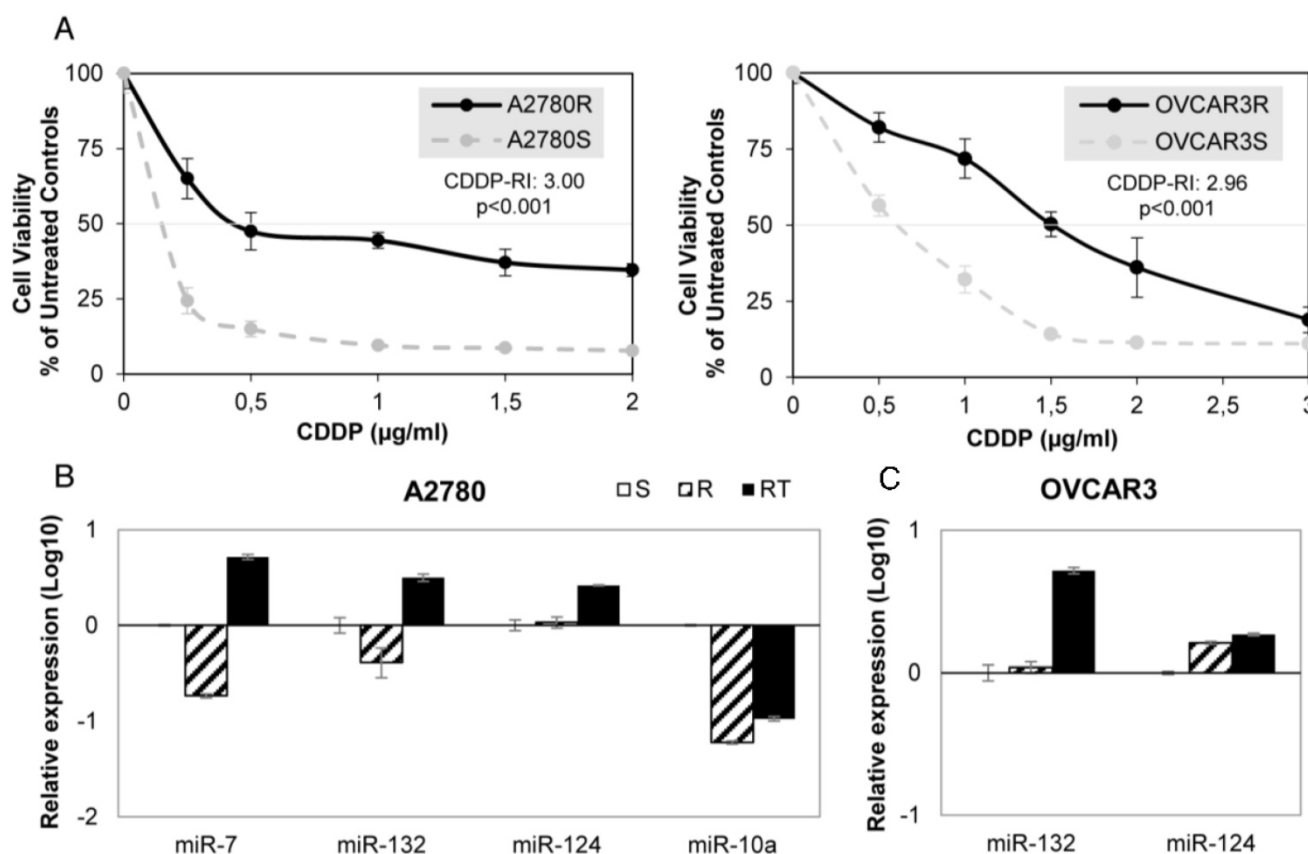


Figure 2: miRNA relative expression on CDDP-sensitive and -resistant ovarian cancer cell lines. (A) Viability curves showing the acquired resistance of A2780 and OVCAR3 cell lines; Cells were exposed for 72 h to each drug concentration. Data were normalized to the untreated control, which was set at 100% and represent the mean + SD of at least 3 independent experiments performed in quadruplicate at each drug concentration tested for every one cell analyzed. IC₅₀ is the inhibitory concentration that kills 50% of the cell population. Resistant index (RI) calculated as IC₅₀ resistant / IC₅₀ sensitive cell line. $p < 0.001$ was considered as a significant change in drug sensitivity (Student's t-test). (B-C) Relative expression levels of the selected miRNAs measured by qRT-PCR. Data are represented in log₁₀ scale and are expressed using the corresponding sensitive (S) line as a calibrator. Each miRNA level was normalized to RNU48 as an endogenous control. Assays were made in the ovarian cancer cell lines A2780 (B) and OVCAR3 (C) in all experimental conditions: S, R and RT. S: sensitive; R: resistant; RT: resistant treated with epigenetic reactivation drugs (5-Aza and TSA). The expression number assays for each miRNA are indicated in Supplementary Table 2.

miR-7 is located on the short arm of chromosome 19, with 2 potential regulatory CGIs: one located 861 bp before the first nucleotide of the miRNA sequence with a length of 667 bp; the second has an extension of 269 bp and comprises the miRNA sequence (Figure 3). Two overlapping pairs of primers were used to analyze the first CGI, covering 776 bp, which included the entire CGI and adjacent areas (Supplementary Table 3). The analysis was performed on the ovarian cancer cells A2780S and A2780R. We found the presence of methylation specifically in the resistant cells. The specific aberrant methylation of miR-7 in resistance was confirmed in H23R cells as well as in the cisplatin resistant cell lines IMIM-PC2 and LoVo, which present an IC₅₀ over 2 μg/ml CDDP (Supplementary Figure 3). OC and LC were used as controls as well as nine additional tumor cell lines. In fact, the sensitive subtypes and controls presented an absence of methylation. A selection of these results is shown in Figure 3, left. This methylation pattern was used to design the MSP primers for the analysis of FFPE primary tumors. The second CGI, was fully

methyated for all the samples tested (Figure 3, right). Therefore, the upstream CpG island of miRNA-7 was selected for our translational approach as it was the candidate downregulated through DNA methylation in CDDP-resistant cells.

miR-7 methylation is a potential predictive biomarker for recurrence and overall survival in patients with ovarian cancer treated with platinum

Response rates, overall survival or progression free survival are recommended by ASCO and ESMO Clinical Practice Guidelines Committees to assess the clinical benefit of chemotherapy treatment [37] [38]. Ovarian Cancer Consensus Meeting, defines 'platinum-refractory' as patients progressing during therapy or within 4 weeks after the last dose; 'platinum-resistant' patients progressing within 6 months of platinum-based therapy; 'partially platinum-sensitive, patients progressing between 6 and 12 months; and 'platinum-sensitive' patients progressing with an interval of more than 12 months

(GCIG Consensus) [39]. Following the international guidelines, we compared the miR-7 methylation levels with OS and PFS clinical parameters on two cohorts of 83 and 55 ovarian cancer patients all of them treated with platinum. We studied the OS for all patients and the PFS in those patients that had recurred at the end of the study to analyze the relationship between platinum response and miR-7 methylation.

We observed a 29% of methylation (24 out of 83 samples) in the cohort from Hospital del Mar (Table 1), which increased to 36% (20 out of 55) in the CHUS-HULP biobank samples, a cohort enriched in serous resistant tumors (Supplementary Table 5). We also observed a higher percentage of methylation in

HGSOC samples from and additional cohort of patients from the CNIO (50% methylated samples) (Supplementary Table 6) and in a small group of the resistant/refractory samples from H. Madrid (57%). We also tested 10 ovarian control samples a non-tumor cell line (IMR90) and 10 PBMCs to discard imprinting and none of them were methylated (100% specificity) (Figure 4A). When correlating our results with the patient's clinical histories we obtained significant data correlating methylation and cisplatin response in the group of 33 patients that recurred. Kaplan-Meier curves show that patients relapsing before 10 months, carried preferentially methylated miR-7 tumors (80% methylated versus 14% unmethylated) (Figure 4B) ($p=0.004$). No differences

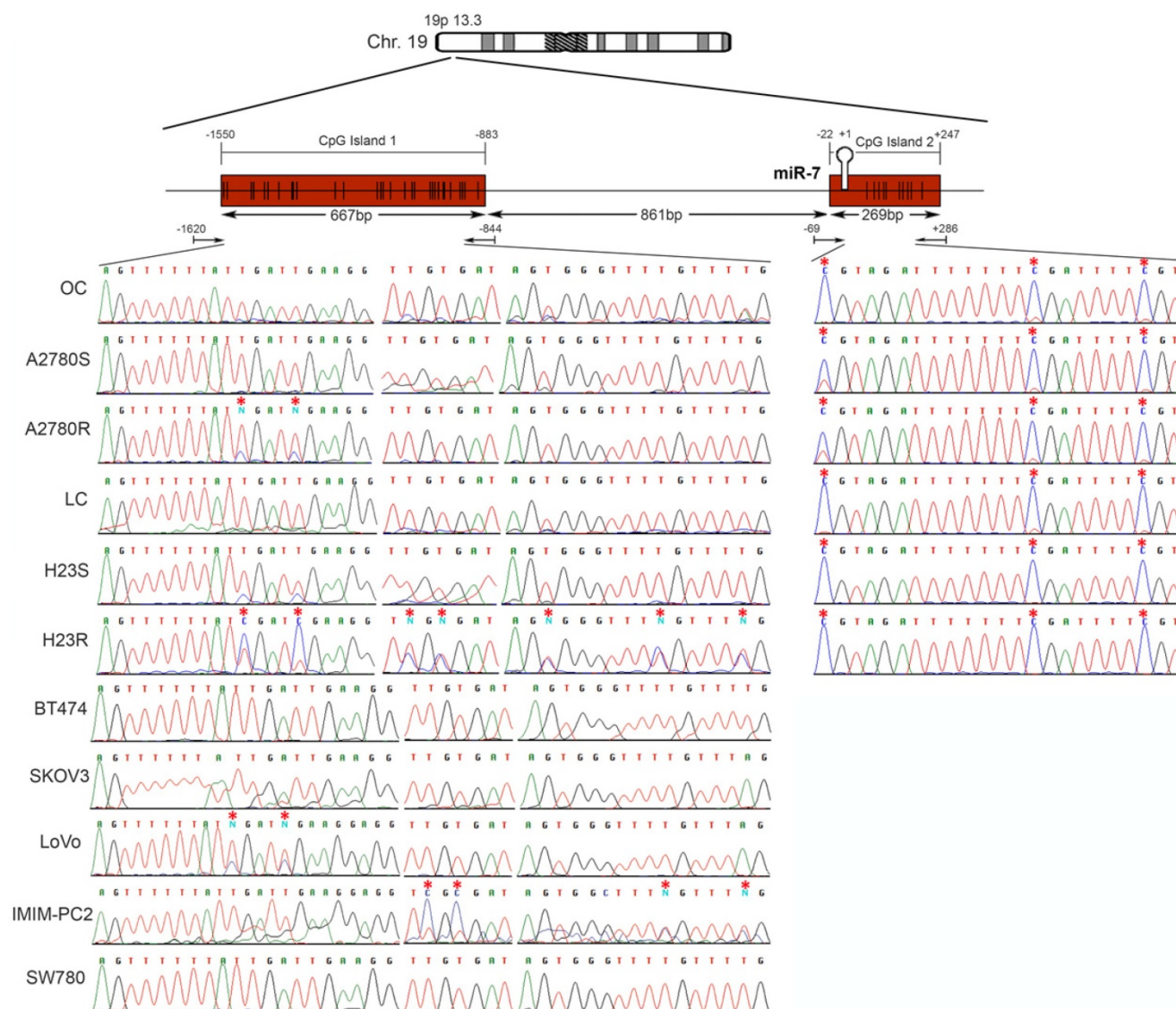


Figure 3. Bisulfite sequencing of miRNA-7 regulatory CGIs. Chromosomal location of miR-7 and their nearby CGIs, as well as representative images of corresponding bisulfite sequences (BS). CGIs are represented in red boxes; each CpG position is characterized by vertical black lines inside the boxes. The first nucleotide of each miRNA is indicated by +1. Facing arrows mark the primer positions used for BS. It is shown the methylation analysis of the two CGIs closely related to the encoded miR-7 region. For the first CGI, the 3 different fragments (left half of the Figure) corresponding to the most frequently methylated positions are shown. A representation of 5 of the 11 additional tumor cell lines interrogated, BT474, SKOV3, LoVo, IMIMPC2 and SW780, is also shown. All CpG positions interrogated at the second CGI were fully methylated in all the samples analyzed (right half of the Figure), as indicated by the presence of C preceding a G in the sites indicated by the asterisks. OC: ovary control; LC: lung control. Asterisks indicate methylated positions.

were found in CDDP-refractory and resistant patients. Moreover, after 3 years of follow up over the 83 patients cohort, the overall survival was significantly higher in the group of patients with an unmethylated tumor in comparison with those with a methylated one (67% vs 35%, $p=0.004$) (Figure 4C). Similar results showing a tendency in terms of PFS and OS were also observed in the CHUS-HULP biobank cohort, although these last results were not statically significant mainly because of a size-limitation (Supplementary Figure 5). Finally, we observed a decrease in the number of patients with higher ECOG status when the promoter region of miR-7 was unmethylated in the higher cohort of patients ($p=0.025$). Accordingly, 62.5% of the patients who harbored the methylated promoter presented ascites compared with 80% of the patients who did not develop ascites harboring an unmethylated promoter region ($p=0.025$) (Table 1). Those results indicate that patients carrying an unmethylated sample tended to have less aggressive tumors, with better progression free survival after platinum treatment and overall survival rates than those who carried the methylated DNA.

MAFG is a direct target gene of miRNA-7

To analyze if the methylation of miR-7 is affecting the cisplatin-cell viability through the silencing of its expression, we overexpressed miR-7 in the resistant subtypes at a final concentration of 40nM (Supplementary Figure 6A). No effect on drug sensitivity was observed although efficiency of the transfection was validated by qRT-PCR, confirming the miR-7 overexpression after 72h in both cell lines (Supplementary Figure 6B). The overexpression of higher concentration of pre-miR-7 (50nM) resulted in a decrease in cell viability, reaching levels of 63% and 52%, respectively, compared with their parental sensitive and resistant cell lines, transfected with the mimic negative control (Supplementary Figure 6C), making unfeasible to evaluate the response to CDDP, given no representative cell population was left from the cell culture after the miR-7 precursor overexpression. Thus, to fully understand the implication of miR-7 in the development of resistance, we investigated the role of the target candidate genes that showed a significant opposite expression to miR-7 and *in silico* complementarity (Figure 1). Out of the 1021 genes that accomplished both conditions we selected only those that were present in A2780 and H23 cell lines and which expression increased in R compared to S and RT subtypes, with a p -value <0.05 adjusted by FDR correction. Further functional web-based annotation using the Gene Ontology Tree Machine (GOTM) tool, grouped 149 genes in 20

significant functional groups, from which we selected *MAFG*, *MAPKAP1*, *ELK-1* and *ABCA1* genes because of their implication in biological functions related to tumor progression (Figure 1, Supplementary Database information). The changes on the expression were confirmed by qRT-PCR in A2780 cells for *MAFG* and slighter but following the expected expression pattern for *ELK-1* (Figure 5A) and in H23 cells for *MAFG* and *ABCA1* (Supplementary Figure 7A). To probe whether *MAFG*, *ELK-1* and/or *ABCA1* are target genes of miR-7, we overexpressed a precursor of miR-7 in the resistant subtypes to assess the changes in expression of the candidate target genes by qRT-PCR. As expected, the overexpression of miR-7 in A2780R resulted in a decrease of the expression of *MAFG* and *ELK-1*, compared with the resistant cell line transfected with the negative control (Figure 5B). *MAFG* regulation was also confirmed in H23R cells, in which the miR-7 precursor lead also to the decrease of the potential candidate gene *ABCA1* (Supplementary Figure 7B). Efficiency of the miR-7 overexpression was validated by qRT-PCR (Figure 5B and Supplementary Figure 7B). A summary of this selection is shown in Supplementary Table 7. Next, we cotransfected in HEK-293T cells the pre-miRNA-7 together with a luciferase reporter vector that carries the 3'-UTR region of each candidate gene. The cotransfection with the 3'-UTR region of *MAFG*, induced a reduction of the luciferase activity at both concentrations, 15 and 30nM of the precursor, effect that was not observed when cotransfecting 3'-UTR regions of *ELK-1* and *ABCA1* (Supplementary Figure 8A, upper panel). Simultaneously, we confirmed through qRT-PCR that the pre-miR-7 was successfully transfected in the 293T cell line, for every experimental group (Supplementary Figure 8A, lower panel). To fully confirm that *MAFG* is a target gene of miR-7, we performed directed-site mutagenesis at the predicted binding sites of miR-7 in the 3' UTR of *MAFG*, at two different regions (Figure 6A), followed by luciferase reporter assays. The significant decrease of luciferase activity observed when using the WT 3'UTR of *MAFG*, disappeared when we cotransfected pre-miR-7 with both constructs containing the mutated regions (Figure 6B). Moreover, to ultimately confirm this regulation, we silenced the expression of miR-7 in A2780S that resulted in increased levels of *MAFG* (Figure 6C). A2780 cells express miR-7 at a low level, as we can observe in Supplementary Figure 8B compared with the control cell line HEK-293T, which explains the low efficiency decreasing the miR-7 levels at 48h, although it was sufficient enough to observe a strong change over *MAFG* expression.

Table 1. Demographic table with the clinicopathological characteristics of a cohort of 83 samples from Hospital del Mar.

Characteristics	Complete series (n=83)		Unmethylated (n=59)		Methylated (n=24)		p
	No. of patients	%	No. of patients	%	No. of patients	%	
Age (median, range)	55 (17-84)		59 (17-80)		55 (18-84)		0.880
Menopausal status							0.565
Premenopausal	34	41.0	23	39.0	11	45.8	
Postmenopausal	49	59.0	36	61.0	13	54.2	
Parity							0.974
No	24	28.9	17	28.8	7	29.2	
Yes	59	71.1	42	71.2	17	70.8	
Familiar history							0.684
No	58	69.9	42	71.2	16	66.7	
Yes	25	30.1	17	28.8	8	33.3	
ECOG							0.025
0	21	25.3	20	33.9	1	4.2	
1	36	43.4	22	37.3	14	58.3	
2	20	24.1	12	20.3	8	33.3	
3	6	7.2	5	8.5	1	4.2	
Ascites							0.025
No	47	56.6	38	64.4	9	37.5	
Yes	36	43.4	21	35.6	15	62.5	
Tumor Grade							0.35
I	34	41	27	45.8	7	29.2	
II	24	28.9	15	25.4	9	37.5	
III	25	30.1	17	28.8	8	33.3	
Histology							0.883
Serous	40	48.2	27	45.8	13	54.2	
Mucinous	9	10.8	7	11.9	2	8.3	
Clear cell	8	9.6	5	8.5	3	12.5	
Endometroid	4	4.8	3	5.1	1	4.8	
Others	22	26.5	17	28.8	5	20.8	
Chemotherapy							0.956
Adjuvant	59	71.1	43	72.9	16	66.7	
Neoadjuvant	6	7.2	3	5.1	3	12.5	
Metastatic	18	21.7	13	22.0	5	20.8	
Platinum sensitivity							0.196
Sensitive	21	63.6	15	71.4	6	50.0	
Resistant	12	36.4	6	28.6	6	50.0	
Relapse							0.286
No	49	59.0	37	62.7	12	50.0	
Yes	34	41.0	22	37.3	12	50.0	
Death							0.119
No	49	59	38	64.4	11	45.8	
Yes	34	41	21	35.6	13	54.2	

The response to cisplatin is mediated by *MAFG* expression in human cancer cell lines

To determine if the expression of the miR-7 candidate target genes was linked to CDDP response, we conducted their *in transient* overexpression in the sensitive cells comparing their response to CDDP with their parental resistant and sensitive cell lines, both transfected with an empty vector.

MAFG overexpression resulted in an increase in the resistance to CDDP in A2780S cells compared with the sensitive cell line transfected with the empty vector, showing a resistance index of 1.6 ($p < 0.001$) (Figure 7A). The same effect was also confirmed in the sensitive cell line H23S reaching a similar CDDP-RI of 1.7 ($p = 0.01$) (Supplementary Figure 9A). The overexpression of *ABCA1* in H23S led to a RI of 1.5 compared with the sensitive cell line transfected with

the empty vector, although it was not statistically significant ($p = 0.796$) (Supplementary Figure 9B). *ELK-1* overexpression in A2780S did not change the response to CDDP after 48 h of exposure to the drug (Figure 7B).

In order to confirm the efficiency of the transfection, we analyzed the mRNA and protein levels by qRT-PCR and western blot of the overexpressed genes. Results confirmed ectopic overexpression of *MAFG*, *ELK-1* and *ABCA1* at 72 h in both cell lines (H23S-*MAFG*, A2780S-*MAFG*, H23S-*ABCA1* and A2780S-*ELK-1*) with an increase of 0.2, 7, 6416 and 28-folds respectively, compared with the sensitive cell lines transfected with the control vector. No changes at protein level were found between 24 and 72 hours when analyzing *MAFG* and *ABCA1* overexpression (Figure 7C and Supplementary Figure 9C). However, we observed a

slightly protein levels of ELK1 at 24h that was not maintained at 72 h (Figure 7C). Therefore, we performed the stable overexpression of *ELK-1* by transduction assays with a lentiviral vector and compare the response to CDDP with the parental-sensitive and resistant subtypes harboring a nonsilencing vector (A2780S/R -NS). As previously observed in the “in transient” experimental assays, *ELK-1* overexpression did not change the sensitivity to CDDP; however, it induced an strongly increase in the number of cells at 0 $\mu\text{g/ml}$ dose, that allowed to maintain higher ratios of survival fraction when treated with CDDP, compared with the control sensitive cell line. We also confirmed the success of the overexpression by qRT-PCR (Figure 7D).

Discussion

Epigenetic alterations by DNA methylation can reduce the expression of a number of miRNAs, altering the therapeutic response in tumor cells and contributing to the onset of more aggressive phenotypes. We intended to deepen our understanding of this aspect, identifying new miRNA-targets of promoter hypermethylation involved in the response to cisplatin, by using an experimental model of paired sensitive and CDDP-resistant tumor cell lines. We established the

ovarian cancer cells A2780R and OVCAR3R, with a CDDP-RI in accordance with the previously established H23R and H460R cell lines, assuming that similar resistant events could follow [20]. Then, we combined an epigenetic reactivation therapy with a global transcriptomic-based strategy. The epigenetic therapy induced an expected reactivation percentage of 12% (87 of the 723 miRNAs), in accordance with published data, using the same technology and pharmacologic unmasking strategy [40]. The differential miRNA expression profile from sensitive, CDDP-resistant and resistant cells under epigenetic reactivation treatment was correlated with the expression of those genes from the same experimental groups that showed complementary sequences. This screening, included an ontological study of routes and processes related to tumor biology for all candidate target genes. We identified a set of 7 miRNAs containing a surrounding CGI that were complementary to target genes involved in cell growth, proliferation, cell migration, drug efflux, angiogenesis or apoptosis inhibition such *MAFG*, *ELK-1*, *RAB6B*, *CAMK2G*, *MAPKAP1*, *ABCA1*, *ABL1* or *STAT3* [41, 42]. All these processes might influence the acquisition of drug-resistance in the CDDP treated cells through the potential miRNA silencing.

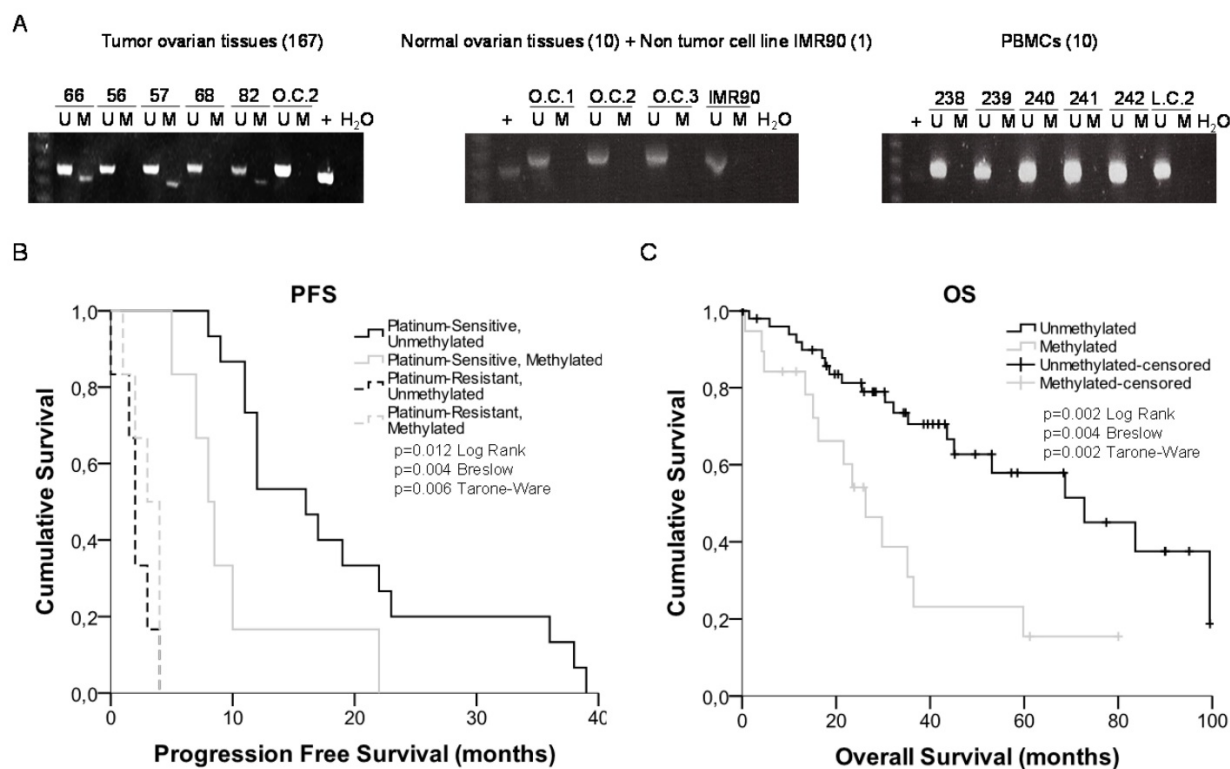


Figure 4. miRNA-7 methylation analysis in primary tumors and survival analysis. (A) Representative MSPs of miRNA-7 nearby CGI in DNA obtained from ovarian tumor tissues, normal ovarian tissues, non-tumor cell line and PBMCs from healthy donors. For each sample, the PCR product in the M lane was considered as the presence of methylated DNA, whereas the amplification product in the U lane was considered as the presence of unmethylated DNA. In vitro methylated DNA was used as a positive control (+). Uncropped gels of Figure 4a are included in Supplementary Figures (Supplementary Figure 4). (B) and (C) Kaplan-Meier comparison between cisplatin treatment and miRNA-7 proximal island methylation in ovarian cancer patients treated with platinum in terms of progression free survival (B) and overall survival in months (C). LogRank, Breslow and Tarone-Ware tests were used for comparisons and $p < 0.05$ was considered as a significant change in OS or PFS. p values in (B) represent the significant difference between sensitive-unmethylated and sensitive-methylated patients

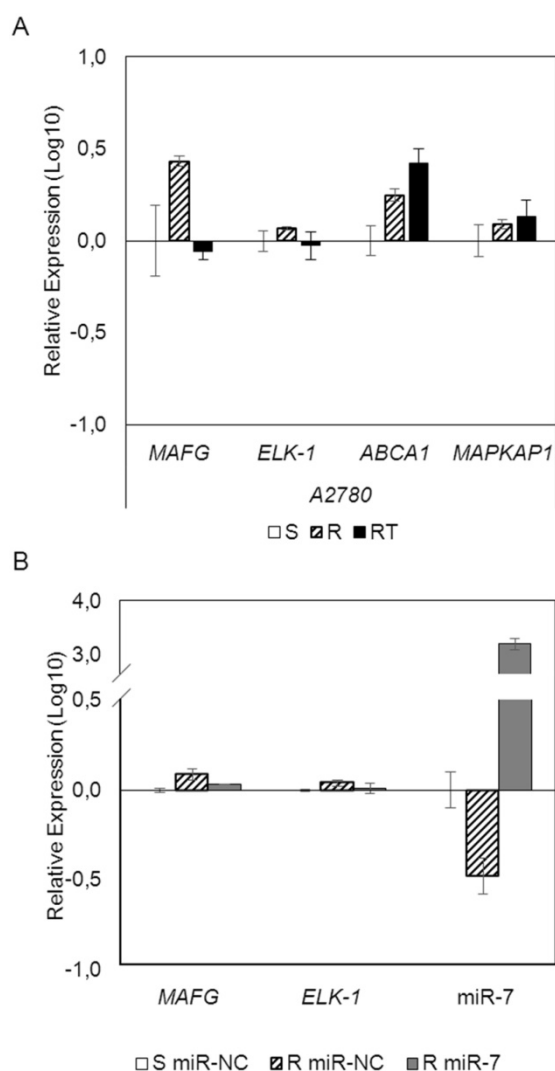


Figure 5. mRNA arrays data validation and effect of miRNA-7 over-expression on candidate target genes in the ovarian cancer cell line A2780. (A) Relative expression levels of the selected genes measured by qRT-PCR. Assays were made in all experimental conditions: S, R and RT. S: sensitive; R: resistant; RT: resistant treated with epigenetic reactivation drugs (5-Aza and TSA). Sensitive cells were used as calibrator. (B) Relative expression levels of *MAFG*, *ELK-1* and *miR-7* measured by quantitative RT-PCR after *miR-7* overexpression. The sensitive cell line transfected with the mimic negative control was used as a calibrator (S miR-NC, white). A2780R cells were transfected with same negative control (R miR-NC, stripped) or with *miR-7* precursor (R miR-7, grey). For both (A) and (B), data are represented in Log10 scale obtained from the combined relative expression of 2 independent experiments measured in triplicate. Each gene expression level was normalized to *GAPDH* or *B-actin* as an endogenous control.

Changes in expression were validated for all 7 candidates, but not in all the expected paired cell lines, indicating that qRT-PCR is a valuable and necessary validation method more restrictive than microarray, that still keeps providing a powerful tool to study the involvement of a large number of miRNAs simultaneously [43, 44]. The expression changes were more significant after unmasking treatment, probably because the pharmacologic combination exerts a synergistic and specific influence in mRNA and miRNA global re-expression, as

described in different tumor types [45]. This effect can be stronger than the silencing observed as a secondary effect of CDDP on DNA methylation.

The expression of *miR-7*, *miR-132*, *miR-335* and *miR-148a* was validated in at least two paired cell lines. Epigenetic validation of those candidates revealed that only one miRNA from our panel, *miR-7*, had specific methylation in CDDP-resistance. *miR-148a* and *miR-132* expression might be regulated by an upstream epigenetic mechanism or transcription factor reactivated by demethylation, as has been reported for other candidates [20, 22]. *miR-335* epigenetic reactivation has been reported in breast cancer cells, confirming the relevance of our approach to identifying miRNAs under epigenetic regulation, although the response after platinum treatment was not studied [46]. We found specific methylation in both, H460S/R cells, but not in the controls and additional cell lines analyzed, suggesting that the downregulation in the resistant phenotypes is probably independent of the methylation profile. We cannot conclude that the downregulation of *miR-335* is affecting the response to platinum, but the sensitivity to the drug seems not to be mediated by DNA methylation.

We focused on the epigenetic regulation of *miR-7* at the upstream CpG island analyzed, as the one encompassing *miR-7* showed constitutive methylation, suggesting the absence of a regulatory role, as reported for other potential regulatory CGIs [47]. The same methylation profile was found in ovarian, lung, colon and pancreatic cisplatin-resistant cell lines. These data suggest a potential epigenetic regulation of *miR-7* at DNA methylation level for this second CGI, a relatively common event in various tumor types, which can present intrinsic resistance to CDDP by epigenetic regulation. We therefore tested the specificity of aberrant *miR-7* hypermethylation as a potential epigenetic biomarker to detect the response to chemotherapy on 167 ovarian cancer patients, all of them treated with platinum-based therapy. An extensive clinical follow-up of 83 of those patients showed that those considered platinum-sensitive, harboring an unmethylated *miR-7* had a better progression free survival rates than those patients with a methylated marker. These differences were not observed in platinum-resistant patients, probably because in these patients the recurrence develop in short-time periods and in a small number of cases. We confirmed the same tendency in an additional smaller cohort of 55 patients. Furthermore, our analysis indicated that those patients carrying an unmethylated marker tended to have less aggressive tumors, with three times more overall survival after platinum treatment than those who carried the

methylated DNA. In addition, the methylation percentage increased in tumor grades III/IV and when analyzing high-serous samples and Platinum-refractory/resistant tumors. Thus, miR-7 methylation could play a role as a clinical tool predicting the aggressive behavior of this malignancy and the poorer response to platinum-based treatment.

We sought then to confirm the role of miR-7 in the response to CDDP, in order to explore the potential therapeutic effect of miR-7 overexpression, as it has been developed for miR-34, the first microRNA mimic to be used in clinical testing as a

theranostic marker (<http://mirnatherapeutics.com>). However, the ectopically overexpression of miRNA-7 in resistant cells did not change their sensitivity to CDDP, although it induced an increase in cell mortality; probably, due to the multifactorial effect that overexpression of miRNAs may cause on the cellular processes by regulating a high number of potential candidates genes. These results validate previous studies, which have shown its possible tumor suppressor role in cancer [48]. Its expression has been also linked with sensitization to paclitaxel [49], although its regulation in this process has not

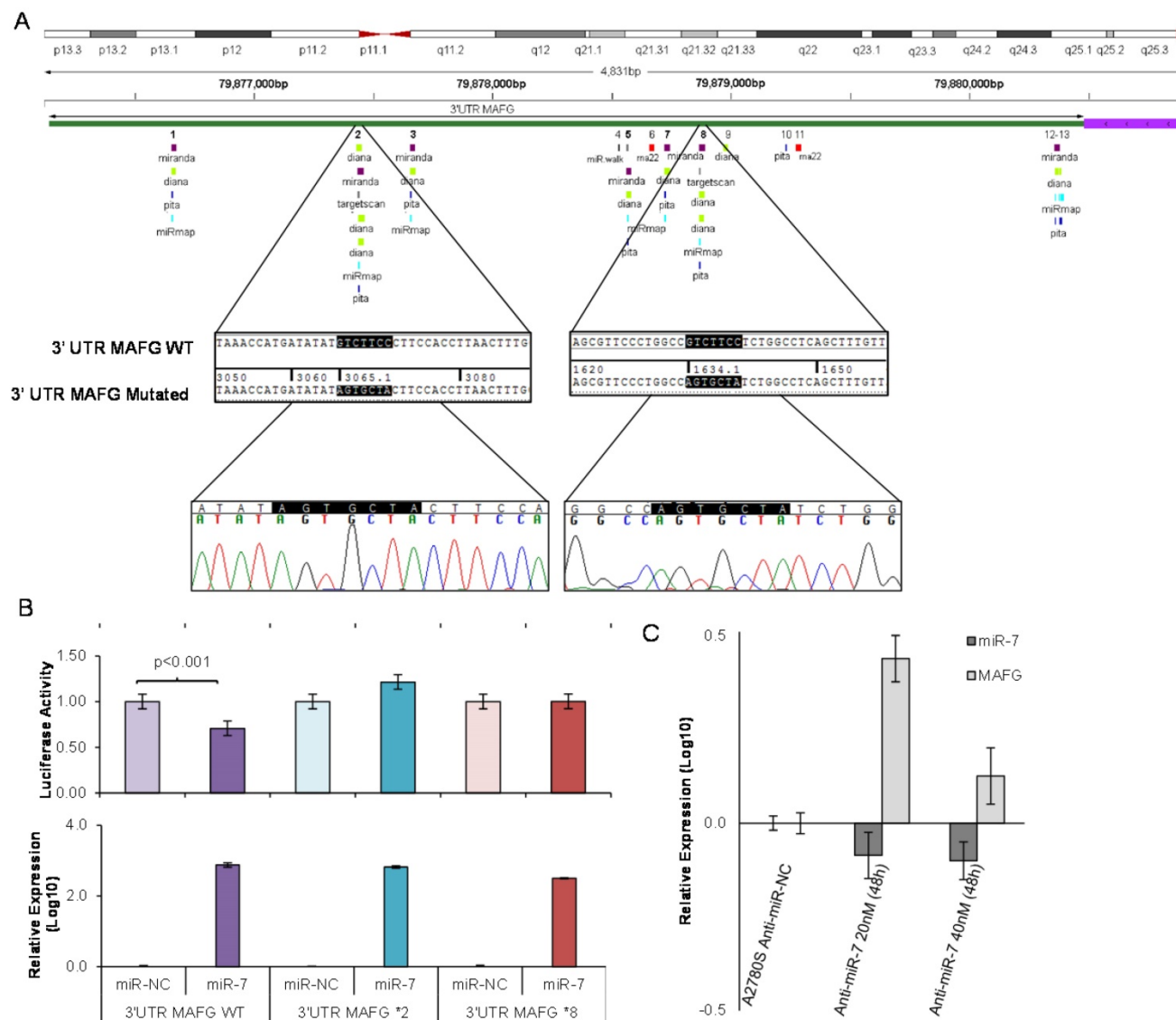


Figure 6. Site-directed mutagenesis for luciferase activity assay and effect of miR-7 silencing over MAFG expression. (A) Chromosomal localization of miR-7 predicted binding sites at 3'UTR of MAFG. Regions 2 and 8 were identified by six or more bioinformatical algorithms. Sanger sequencing showed that the seed sequence of miR-7 was fully mutated at regions 2 and 8 of the 3' UTR of MAFG. (B) Co-transfection of mimic miR-7 (miR-7) or mimic control (miR-NC) with the 3' UTR of MAFG WT, mutated on region 2 (MAFG 2*) and mutated on region 8 (MAFG 8*). Experiments were performed at 15nM and data was analyzed after 24h of co-transfection. (Upper panel) Relative luciferase activity. The figures represent the mean \pm SD of at least 3 independent experiments after data normalization with Renilla and the data from the negative control 3'-UTR; $p < 0.01$ was considered as significant change in Luciferase activity (Student's t-test). (Lower panel) Relative miR-7 expression levels measured by qRT-PCR after co-transfection, as an internal control for the mimic transfection. Each bar represents the combined relative expression of 2 independent experiments measured in triplicate. The miR-NC co-transfected with the 3'-UTR of each tested group was used as calibrator. (C) Relative miR-7 and MAFG expression levels measured by qRT-PCR after silencing of miR-7 with antago-miR in A2780S cells. Two different concentrations of Anti-miR-7 were tested, 20nM and 40 nM. Data was analyzed at 48h after transfection. Each bar represents the combined relative expression of 2 independent experiments measured in triplicate. A2780S cells transfected with the Anti-miR Negative Control was used as calibrator.

being defined. miR-7 might be involved in these processes through the regulation of its target genes, whose overexpression has been found in our experimental approach. Using a transcriptomic profile together with the *in silico* assembling of sequences, we identified a group of genes candidate to be targets of miR-7 that could provide cells with the oncogenic capabilities described by Hanahan and Weinberg [50]. Further analysis of molecular pathways and cellular functions, led us to the selection of *MAFG*, *ELK-1*, *ABCA1* and *MAPKAP1* genes. Validation by alternative techniques and overexpression of miR-7 in the resistant cell lines, revealed that *MAFG*, *ABCA1* and *ELK-1* recovered their levels of expression after epigenetic treatment and overexpression of miR-7, thus indicating a possible regulation of these genes by the methylation of this miRNA. However, our functional studies performed with luciferase vectors carrying a mutation in the conserved miR-7 binding site, revealed that only *MAFG* seems to be a direct candidate target gene under miR-7 regulation. Moreover, the silencing of miR-7 expression resulted in increased levels of *MAFG* and its overexpression is able to strongly increase the resistance to CDDP in sensitive cells. miR-7 may be an indirect regulator of *ABCA1* and *ELK-1*, in fact, it has been reported that miR-7 could act as modulator of chemoresistance by targeting the *MRP1/ABCC1*, a member of the ABC family proteins, and being involved in lung tumorigenesis by directly regulating the *EGFR* expression [51-53]. Moreover, *ABCA1* upregulation has been related to the decrease in chemotherapy response in breast cancer. However, we could not find a significant increase of resistance to CDDP after *ABCA1* overexpression, possibly because of the different schema of treatment used in this study, based on sequential paclitaxel/neoadjuvant chemotherapy [54]. The inhibition of *ELK-1* through the drug silodosin has been reported to increase the response to cisplatin in bladder cancer cells [55]. Its overexpression in ovarian cancer cells did not change the sensitivity to CDDP; nevertheless, we observed an increase in the cell survival fraction. As *ELK-1* is a nuclear target of the MAP-kinases cascade and the *EGFR*-signaling pathway, and miR-7 is a direct regulator of *EGFR* gene, we believe that our results are a consequence of the highly implication of *ELK-1* in cell proliferation and apoptosis through these signaling routes [56].

MAFG is associated with detoxification in oxidative stress situations. This leads us to believe that its involvement in the acquired resistance to platinum resides in the protection it confers against free radicals generated in the cell after the administration of this drug [57-61]. Despite the fact

that sMafs family, to which *MAFG* belongs, have been associated with cellular response, little is known about their involvement in human diseases. A number of studies have however linked these proteins with cancer, such as the study by Schembri et al. on *MAFG* regulation by miR-218 as an indicator of smoking-induced disease processes in the lungs [62] and the study by Yang et al. on the relationship between increased *MAFG* and growth in colon cancer cell lines through the insulin-like growth factor-I actions [63]. Taken together, our experimental results strongly support the direct regulation of *MAFG* through miR-7 and their involvement in the development of CDDP resistance in human tumor cells.

In the present manuscript, we introduce the epigenetic regulation of miR-7 as a mechanism involved in platinum-resistance in cancer cell lines directly regulating the action of *MAFG*, which is overexpressed in resistant phenotypes. To the best of our knowledge, this is the first report linking the regulation of *MAFG* by miRNA-7 and its role in chemotherapy response to CDDP. Moreover, miR-7 methylation arises as a potential predictive biomarker for the identification of ovarian cancer patients that may present worst response to platinum-derived treatment in terms of OS and PFS. Furthermore, this data captures the interest of researchers due to the possible role *MAFG* plays as a novel therapeutic target for platinum resistant tumors.

Abbreviations

miRNAs: microRNAs; RI: Resistance Index; CGI: CpG island; CDDP: cisplatin; qRT-PCR: quantitative Real Time-PCR; BS: bisulfite sequencing; NSCLC: non-small cell lung cancer; PBMCs: peripheral blood mononuclear cells; mSP: Methylation Specific PCR.

Supplementary Material

Additional File 1:

Supplementary figures and tables.

<http://www.thno.org/v07p4118s1.pdf>

Additional File 2:

Supplementary database information.

<http://www.thno.org/v07p4118s2.pdf>

Acknowledgments

The authors thank ServingMed.com for the English language correction and D L for the biostatistical analysis. The authors also acknowledge Biobank from HULP for sample processing.

Financial support

FIS (ISCIII) and FEDER/FSE funds (PI12/00386, PI12/01463, PI14/01495, PI15/00186, and

FEDER/FSE, Una manera de hacer Europa support the study and contracts of I.I.C. and O.V. PTA2012/7141-I funds support OP contract and I.I.C. was financed by the “Miguel Servet” program (CP

14/00008). The authors gratefully acknowledge the Colombian Department for Science, Technology and Innovation (COLCIENCIAS), Cod.568-2012, for partially funding this work to J.S.

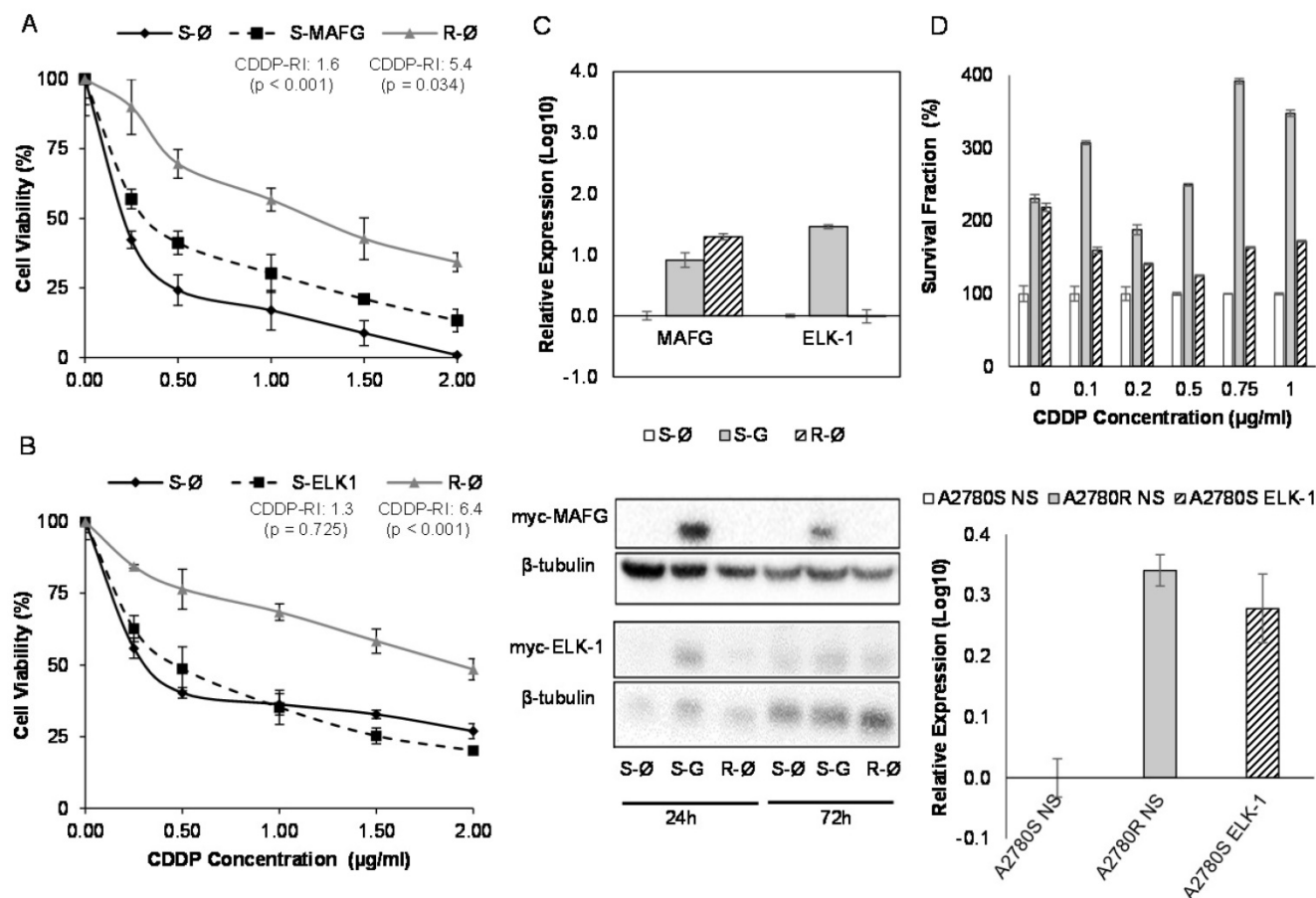


Figure 7. Effect of overexpression of MAFG and ELK-1 on cell sensitivity to CDDP in A2780 cell lines. (A-B) Viability curves of A2780 cell lines transfected with pCMV6 (S-Ø and R-Ø) and with the overexpression vectors (S-MAFG and S-ELK-1). Each experimental group was exposed for 48 h to 6 different CDDP concentrations, and data were normalized to each untreated control, set to 100%. The data represent the mean ± SD of at least 3 independent experiments performed in quadruplicate at each drug concentration for each cell line analyzed. The CDDP-RI (Resistant Index to CDDP) was calculated as "IC50 from the R-Ø / IC50 from the S-Ø" and "IC50 from the S-transfected with the gene / IC50 from the S-Ø" ± SD. p < 0.01 was considered as significant change in drug sensitivity (Student's t-test). (C) Validation of the transfection efficacy at mRNA and protein levels. Top, Relative expression levels of MAFG and ELK-1 measured by quantitative RT-PCR, in the cell line A2780, represented in Log10 scale; In each experimental group, the sensitive cell line transfected with pCMV6 plasmid was used as a calibrator. Each bar represents the combined relative expression of 2 independent experiments measured in triplicate. Bottom, total cell protein (20µg) at 24 and 72 hours was subjected to VVB, membranes were hybridized with antibodies against c-Myc and β-tubulin as loading control. S: Sensitive; S-G: Sensitive transfected with the gene; R: Resistant; β-tub: β-tubulin. (D) Stable overexpression of ELK-1 in A2780S cell line. Top, Viability assay after the nonsilencing (NS) plasmid transductions (S-NS white; R-NS stripped) and overexpressing ELK-1 plasmid (S-ELK-1 grey). Each experimental group was exposed for 72 h to 6 different CDDP concentrations, and data were normalized to each sensitive subtype. Data represents the mean ± SD of at least 3 independent experiments performed with 4 wells at each drug concentration for each cell line analyzed. Bottom, relative ELK-1 expression levels measured by qRT-PCR and represented in Log10 scale. The sensitive cell line with nonsilencing vector was used as a calibrator. Each bar represents the combined relative expression of 2 independent experiments measured in triplicate.

Author Contributions

IIC Conception and design.

OV, JJ, OP, CRA, CR, JS and IIC Development of methodology.

OV, JJ, OP, JS, RR, AD, IER and IIC acquisition of data.

OV, JJ, CRA, CR, JV, FR, RP, JDC analysis and interpretation of data.

SLM, RA, FR, CB, JB, IER and JDC provided clinical samples and histories.

All the authors Write, review and/or revised the manuscript.

Competing Interests

The authors have declared that no competing interest exists. Current state of intellectual property:

Spanish patent P201530997, PCT/ES2016/070516 (November 2016).

References

- Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res.* 2001; 478: 23-43.
- Ho GY, Woodward N, Coward JI. Cisplatin versus carboplatin: comparative review of therapeutic management in solid malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016.
- Nogales V, Reinhold WC, Varma S, Martinez-Cardus A, Moutinho C, Moran S, et al. Epigenetic inactivation of the putative DNA/RNA helicase SLFN11 in human cancer confers resistance to platinum drugs. *Oncotarget.* 2016; 7: 3084-97.
- Murphy M, Stordal B. Erlotinib or gefitinib for the treatment of relapsed platinum pretreated non-small cell lung cancer and ovarian cancer: a systematic review. *Drug Resist Updat.* 2011; 14: 177-90.
- van Moorsel CJ, Pinedo HM, Veerman G, Bergman AM, Kuiper CM, Vermorken JB, et al. Mechanisms of synergism between cisplatin and gemcitabine in ovarian and non-small-cell lung cancer cell lines. *Br J Cancer.* 1999; 80: 981-90.
- Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, et al. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.* 2001; 61: 4766-72.
- Heyn H, Esteller M. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat Rev Genet.* 2012; 13: 679-92.
- Cortes-Sempere M, de Miguel MP, Pernia O, Rodriguez C, de Castro Carpeno J, Nistal M, et al. IGFBP-3 methylation-derived deficiency mediates the resistance to cisplatin through the activation of the IGFIR/Akt pathway in non-small cell lung cancer. *Oncogene.* 2013; 32: 1274-83.
- Cao J, Song Y, Bi N, Shen J, Liu W, Fan J, et al. DNA methylation-mediated repression of miR-886-3p predicts poor outcome of human small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2013; 73: 3326-35.
- Weichenhan D, Plass C. The evolving epigenome. *Hum Mol Genet.* 2013; 22: R1-6.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 15524-9.
- Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell.* 2012; 148: 1172-87.
- Bui TV, Mendell JT. Myc: Maestro of MicroRNAs. *Genes Cancer.* 2010; 1: 568-75.
- Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 15805-10.
- Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Advances in cancer research.* 1998; 72: 141-96.
- Marks PA, Richon VM, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylase inhibitors. *Advances in cancer research.* 2004; 91: 137-68.
- Xu S, Ren J, Chen HB, Wang Y, Liu Q, Zhang R, et al. Cytostatic and apoptotic effects of DNMT and HDAC inhibitors in endometrial cancer cells. *Curr Pharm Des.* 2014; 20: 1881-7.
- Ibragimova I, Ibanez de Caceres I, Hoffman AM, Potapova A, Dulaimi E, Al-Saleem T, et al. Global reactivation of epigenetically silenced genes in prostate cancer. *Cancer Prev Res (Phila).* 2010; 3: 1084-92.
- Chen DQ, Pan BZ, Huang JY, Zhang K, Cui SY, De W, et al. HDAC 1/4-mediated silencing of microRNA-200b promotes chemoresistance in human lung adenocarcinoma cells. *Oncotarget.* 2014; 5: 3333-49.
- Ibanez de Caceres I, Cortes-Sempere M, Moratilla C, Machado-Pinilla R, Rodriguez-Fanjul V, Manguan-Garcia C, et al. IGFBP-3 hypermethylation-derived deficiency mediates cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Oncogene.* 2010; 29: 1681-90.
- Chattopadhyay S, Machado-Pinilla R, Manguan-Garcia C, Belda-Iniesta C, Moratilla C, Cejas P, et al. MKP1/CL100 controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in non-small-cell lung cancer. *Oncogene.* 2006; 25: 3335-45.
- Ibanez de Caceres I, Dulaimi E, Hoffman AM, Al-Saleem T, Uzzo RG, Cairns P. Identification of novel target genes by an epigenetic reactivation screen of renal cancer. *Cancer Res.* 2006; 66: 5021-8.
- Gayarre J, Kamieniak MM, Cazorla-Jimenez A, Munoz-Repetto I, Borrego S, Garcia-Donas J, et al. The NER-related gene GTF2H5 predicts survival in high-grade serous ovarian cancer patients. *J Gynecol Oncol.* 2016; 27: e7.
- Alexiou P, Maragkakos M, Papadopoulos GL, Reczko M, Hatzigeorgiou AG. Lost in translation: an assessment and perspective for computational microRNA target identification. *Bioinformatics.* 2009; 25: 3049-55.
- Wang J, Duncan D, Shi Z, Zhang B. WEB-based Gene Set Analysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41: W77-83.
- Dweep H, Gretz N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat Methods.* 2015; 12: 697.
- Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42: D68-73.
- Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: E65-5.
- Sandovici I, Leppert M, Hawk PR, Suarez A, Linares Y, Sapienza C. Familial aggregation of abnormal methylation of parental alleles at the IGF2/H19 and IGF2R differentially methylated regions. *Hum Mol Genet.* 2003; 12: 1569-78.
- Sanchez-Perez I, Murguía JR, Perona R. Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death. *Oncogene.* 1998; 16: 533-40.
- Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 2004; 3: Article3.
- Takai D, Jones PA. The CpG island searcher: a new WWW resource. *In Silico Biol.* 2003; 3: 235-40.
- Augello C, Vaira V, Caruso L, Destro A, Maggioni M, Park YN, et al. MicroRNA profiling of hepatocarcinogenesis identifies C19MC cluster as a novel prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 2012; 32: 772-82.
- Tsai KW, Kao HW, Chen HC, Chen SJ, Lin WC. Epigenetic control of the expression of a primate-specific microRNA cluster in human cancer cells. *Epigenetics.* 2009; 4: 587-92.
- Court F, Tayama C, Romanelli V, Martin-Trujillo A, Iglesias-Platas I, Okamura K, et al. Genome-wide parent-of-origin DNA methylation analysis reveals the intricacies of human imprinting and suggests a germline methylation-independent mechanism of establishment. *Genome Res.* 2014; 24: 554-69.
- Noguer-Dance M, Abu-Amro S, Al-Khtib M, Lefevre A, Coullin P, Moore GE, et al. The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta. *Hum Mol Genet.* 2010; 19: 3566-82.
- Wright AA, Bohlke K, Armstrong DK, Bookman MA, Cliby WA, Coleman RL, et al. Neoadjuvant Chemotherapy for Newly Diagnosed, Advanced Ovarian Cancer: Society of Gynecologic Oncology and American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol.* 2016; 34: 3460-73.
- Ledermann JA, Raja FA, Fotopoulou C, Gonzalez-Martin A, Colombo N, Sessa C, et al. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2013; 24 Suppl 6: vi24-32.
- Friedlander M, Trimble E, Tinker A, Alberts D, Avall-Lundqvist E, Brady M, et al. Clinical trials in recurrent ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2011; 21: 771-5.
- Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sanchez-Cespedes M, Blanco D, et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105: 13556-61.
- Hanrahan V, Currie MJ, Gunningham SP, Morrin HR, Scott PA, Robinson BA, et al. The angiogenic switch for vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF-B, VEGF-C, and VEGF-D in the adenoma-carcinoma sequence during colorectal cancer progression. *J Pathol.* 2003; 200: 183-94.
- Iwasaki H, Okabe T, Takara K, Yoshida Y, Hanashiro K, Oku H. Down-regulation of lipids transporter ABCA1 increases the cytotoxicity of nitidine. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010; 66: 953-9.
- Calura E, Fruscio R, Paracchini L, Bignotti E, Ravaggi A, Martini P, et al. MIRNA landscape in stage I epithelial ovarian cancer defines the histotype specificities. *Clin Cancer Res.* 2013; 19: 4114-23.
- Wang G, Wang R, Strulovici-Barel Y, Salit J, Staudt MR, Ahmed J, et al. Persistence of smoking-induced dysregulation of miRNA expression in the small airway epithelium despite smoking cessation. *PLoS One.* 2015; 10: e0120824.
- Adi Harel S, Bossel Ben-Moshe N, Aylon Y, Bublik DR, Moskovits N, Toperoff G, et al. Reactivation of epigenetically silenced miR-512 and miR-373 sensitizes lung cancer cells to cisplatin and restricts tumor growth. *Cell Death Differ.* 2015; 22: 1328-40.
- Png KJ, Yoshida M, Zhang XH, Shu W, Lee H, Rimner A, et al. MicroRNA-335 inhibits tumor reinitiation and is silenced through genetic and epigenetic mechanisms in human breast cancer. *Genes Dev.* 2011; 25: 226-31.
- Lopez-Lera A, Pernia O, Lopez-Trascasa M, Ibanez de Caceres I. Expression of the SERPINC1 gene is not regulated by promoter hypermethylation in peripheral blood mononuclear cells from patients with hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Orphanet J Rare Dis.* 2014; 9: 103.
- Ma J, Fang B, Zeng F, Pang H, Zhang J, Shi Y, et al. Curcumin inhibits cell growth and invasion through up-regulation of miR-7 in pancreatic cancer cells. *Toxicol Lett.* 2014; 231: 82-91.
- Liu R, Liu X, Zheng Y, Gu J, Xiong S, Jiang P, et al. MicroRNA-7 sensitizes non-small cell lung cancer cells to paclitaxel. *Oncol Lett.* 2014; 8: 2193-200.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144: 646-74.
- Liu H, Wu X, Huang J, Peng J, Guo L. miR-7 modulates chemoresistance of small cell lung cancer by repressing MRP1/ABCC1. *Int J Exp Pathol.* 2015; 96: 240-7.
- Chou YT, Lin HH, Lien YC, Wang YH, Hong CF, Kao YR, et al. EGFR promotes lung tumorigenesis by activating miR-7 through a Ras/ERK/Myc pathway that targets the Ets2 transcriptional repressor ERF. *Cancer Res.* 2010; 70: 8822-31.
- Webster RJ, Giles KM, Price KJ, Zhang PM, Mattick JS, Leedman PJ. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7. *J Biol Chem.* 2009; 284: 5731-41.

54. Park S, Shimizu C, Shimoyama T, Takeda M, Ando M, Kohno T, et al. Gene expression profiling of ATP-binding cassette (ABC) transporters as a predictor of the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2006; 99: 9-17.
55. Kawahara T, Ide H, Kashiwagi E, Patterson JD, Inoue S, Shareef HK, et al. Silodosin inhibits the growth of bladder cancer cells and enhances the cytotoxic activity of cisplatin via ELK1 inactivation. *Am J Cancer Res.* 2015; 5: 2959-68.
56. Smedberg JL, Smith ER, Capo-Chichi CD, Frolov A, Yang DH, Godwin AK, et al. Ras/MAPK pathway confers basement membrane dependence upon endoderm differentiation of embryonic carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2002; 277: 40911-8.
57. Katsuoka F, Motohashi H, Engel JD, Yamamoto M. Nrf2 transcriptionally activates the mafG gene through an antioxidant response element. *J Biol Chem.* 2005; 280: 4483-90.
58. Katsuoka F, Yamamoto M. Small Maf proteins (MafF, MafG, MafK): History, structure and function. *Gene.* 2016; 586: 197-205.
59. Kilic U, Kilic E, Tuzcu Z, Tuzcu M, Ozercan IH, Yilmaz O, et al. Melatonin suppresses cisplatin-induced nephrotoxicity via activation of Nrf-2/HO-1 pathway. *Nutr Metab (Lond).* 2013; 10: 7.
60. Li W, Yu S, Liu T, Kim JH, Blank V, Li H, et al. Heterodimerization with small Maf proteins enhances nuclear retention of Nrf2 via masking the NESzip motif. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1783: 1847-56.
61. Motohashi H, Katsuoka F, Miyoshi C, Uchimura Y, Saitoh H, Francastel C, et al. MafG sumoylation is required for active transcriptional repression. *Mol Cell Biol.* 2006; 26: 4652-63.
62. Schembri F, Sridhar S, Perdomo C, Gustafson AM, Zhang X, Ergun A, et al. MicroRNAs as modulators of smoking-induced gene expression changes in human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 2319-24.
63. Yang H, Li TW, Peng J, Mato JM, Lu SC. Insulin-like growth factor 1 activates methionine adenosyltransferase 2A transcription by multiple pathways in human colon cancer cells. *Biochem J.* 2011; 436: 507-16.

MAFG is a potential therapeutic target to restore chemosensitivity in cisplatin-resistant cancer cells by increasing reactive oxygen species



OLGA VERA-PUENTE¹, CARLOS RODRIGUEZ-ANTOLIN¹, ANA SALGADO-FIGUEROA, PATRYCJA MICHALSKA, OLGA PERNIA, BRETT M. REID, ROCÍO ROSAS, ALVARO GARCIA-GUEDE, SILVIA SACRISTÁN, JULIA JIMENEZ, ISABEL ESTEBAN-RODRIGUEZ, M. ELENA MARTIN, THOMAS A. SELLERS, RAFAEL LEÓN, VÍCTOR M. GONZALEZ, JAVIER DE CASTRO, and INMACULADA IBANEZ DE CACERES²

MADRID, SPAIN; AND TAMPA, FLORIDA

ABSTRACT

Adjuvant chemotherapy for solid tumors based on platinum-derived compounds such as cisplatin is the treatment of choice in most cases. Cisplatin triggers signaling pathways that lead to cell death, but it also induces changes in tumor cells that modify the therapeutic response, thereby leading to cisplatin resistance. We have recently reported that microRNA-7 is silenced by DNA methylation and is involved in the resistance to platinum in cancer cells through the action of the musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein G (*MAFG*). In the present study, we first confirm the miR-7 epigenetic regulation of *MAFG* in 44 normal- and/or tumor-paired samples in non-small-cell lung cancer (NSCLC). We also provide translational evidence of the role of *MAFG* and the clinical outcome in NSCLC by the interrogation of two extensive in silico databases of 2019 patients. Moreover, we propose that *MAFG*-mediated resistance could be conferred due to lower reactive oxygen species production after cisplatin exposure. We developed specifically selected aptamers against *MAFG*, with high sensitivity to detect the protein at a nuclear level probed by aptacytochemistry and histochemistry analyses. The inhibition of *MAFG* activity through the action of the specific aptamer apMAFG6F increased the levels of reactive oxygen species production and the sensitivity to cisplatin. We report first the specific nuclear identification of *MAFG* as a novel detection method for diagnosis in

Both authors contributed equally to this work.

Inmaculada Ibanez-de Caceres, PhD is an Assistant Professor in the Molecular and Medical Genetics Institute and Head of the Cancer Epigenetics Laboratory. Dr. Ibanez-de Caceres's research is focused on identifying new molecular markers predicting response to chemotherapy in solid tumors and, in collaboration with clinical research colleagues, developing these markers as screening tests for clinical use.

From the Cancer Epigenetics Laboratory, INGEMM, La Paz University Hospital, Madrid, Spain; Biomarkers and Experimental Therapeutics in Cancer, IdiPAZ, Madrid, Spain; Department of Biochemistry Research, Laboratory of Aptamers, IRYCIS-Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain; Biomedical Research Foundation of University Hospital La Princesa, Madrid, Spain; Institute Teófilo Hernando and Department of Pharmacology and Therapeutics, Autonomous University of Madrid, Madrid, Spain; Department of Cancer Epidemiology, MOFFITT Cancer Center, Tampa, Florida; Department of Pathology, La Paz University Hospital, Madrid, Spain.

Submitted for Publication February 14, 2018; received submitted June 6, 2018; accepted for publication June 17, 2018.

Reprint requests: Inmaculada Ibañez de Caceres, Biomarkers and Experimental Therapeutics in Cancer, Cancer Epigenetics Laboratory, INGEMM, La Paz University Hospital, Paseo de la Castellana 261, 28046 Madrid, Spain. e-mail: inma.ibanezca@salud.madrid.org.

1931-5244/\$ - see front matter

© 2018 The Author(s). Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.06.005>

NSCLC, and then we report that MAFG modulates the redox response and confers cell protection against free radicals generated after platinum administration, thus also being a promising therapeutic target. (Translational Research 2018; 200:1–17)

Abbreviations: ATT = adjacent tumor tissues; CDDP = cisplatin; MAFG = musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein G; miR-7 = microRNA-7; NSCLC = non-small-cell lung cancer; qMSP = quantitative methylation-specific PCR; qRT-PCR = quantitative real-time PCR; ROS = reactive oxygen species; TCC = Moffitt's Total Cancer Care; TCGA = The Cancer Genome Atlas

AT A GLANCE COMMENTARY

Vera-Puente O et al.

Background

We have recently reported that microRNA-7 is silenced by DNA methylation and is involved in the resistance to platinum in cancer cells through the action of the musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein G (*MAFG*).

Translational Significance

In the present manuscript, we study the molecular mechanism underlying cisplatin (CDDP)-resistance mediated by MAFG in human cancer cell lines by analyzing the reactive oxygen species production after CDDP treatment. We have also identified highly-specific aptamers against MAFG that modulate its activity. The final intention of our work is to provide new tools for the diagnosis and therapeutic treatment of CDDP-resistant tumors by targeting MAFG with aptamers.

INTRODUCTION

Cisplatin (CDDP) is the current and most widely used chemotherapeutic agent in solid malignancies, including lung and ovarian cancers. CDDP is a platinum compound that binds to and crosslinks DNA, thus inducing apoptosis in cancer cells.^{1,2} CDDP has also been reported to generate an increase in oxidative stress by increasing levels of the superoxide anion, H₂O₂, and hydroxyl radicals that can lead to cell death, enhancing CDDP action.^{3,4} Despite a reasonable rate of initial response, however, CDDP treatment frequently results in chemoresistance development, leading to therapeutic failure in these tumor types. Many studies and reviews in the last 30 years have centered on gaining insight into the molecular mechanisms that account for the CDDP-resistant phenotype of tumor cells, which could provide crucial information for treatment resensitizing.^{4,5} A number of events have been proposed to underlie this phenomenon. One such event consists of the ability of cancer cells to overcome

the reactive oxygen species (ROS) generated by CDDP, thus avoiding apoptosis. The complex cellular response against ROS is mainly mediated through the antioxidant response element (ARE), nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2), and the small MAF proteins (sMAFs) family of transcription factors.⁶ The accumulation of reactive oxygen or nitrogen species in the cell triggers the translocation of NRF2 to the nucleus, where it interacts with sMAFs. NRF2-sMAF heterodimers are the predominant complexes that bind to the ARE and promote the transcription of detoxification genes.^{7–12} An overexpression of these elements could be responsible for acquired resistance to CDDP. In fact, we recently reported that miR-7 hypermethylation-derived deficiency mediates CDDP resistance and identified *MAFG* as a miR-7-direct target gene that is upregulated in CDDP-resistant tumor cells. Furthermore, miR-7 overexpression resulted in a repression of *MAFG* expression in lung and ovarian human cancer cells.¹³ Our previous results suggest a relevant role for *MAFG* conferring resistance to ROS-inducing compounds such as CDDP via the increased detoxification of free radicals. In addition, despite its important role in ROS detoxification, little is known about the involvement of *MAFG* in human diseases.

In the present study, we have studied in depth the role of the miR-7 and/or *MAFG* axis in acquired resistance to CDDP in lung cancer and explored MAFG as a possible diagnostic and therapeutic target by developing aptamers that show high affinity for the protein as a novel approach for chemotherapy resensitization. Aptamers are a recently developed alternative to specific biomolecule recognition; they are single-stranded nucleic acid molecules with high affinity for a particular target due to their ability to fold into tertiary shapes. These oligonucleotides are generated from an in vitro selection process and can be considered a novel alternative in therapy, diagnosis, and in the development of new biotechnological tools.^{14–16}

MATERIALS AND METHODS

Cell cultures and treatments. The human cancer cells H23 and A2780, and the HEK-293T epithelial cells

were purchased from ATCC (Manassas, USA) and ECACC (Sigma, Spain) and cultured as recommended. The CDDP-resistant variants H23R and A2780R were established in our laboratory as previously described,^{13,17} using CDDP (Farma Ferrer, Spain) for cell viability assays. To validate the results obtained from the resistant cell lines established in our laboratory, we also used the CDDP-resistant lung cancer cell line H1299, with IC50 over 7, purchased from ATCC and maintained as recommended. Cell authentication is shown in Supplementary Table 3.

Clinical sample and data collection. Fresh-frozen tumors (T) and adjacent-tumor tissue (ATT)-paired samples were obtained from 22 patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC) from La Paz University Hospital. All patients had both a perioperative positron emission tomography-computed tomography scan showing localized disease and a pathological confirmation of stages after having undergone a complete resection for a histologically confirmed early NSCLC. Follow-up was conducted according to the criteria of the medical oncology division from the institution. In addition, five saliva samples from healthy donors were used as controls. All samples were collected after the approval of the appropriate Human Research Ethics Committee at the contributing center, including an informed consent within the context of research. Clinical, pathological, and therapeutic data were recorded by an independent observer, and a blind statistical analysis was performed on the data.

RNA isolation, RT-PCR, and quantitative RT-PCR. Total RNA from surgical samples was isolated, reverse transcribed and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis was performed as previously described.^{17,18} Samples were analyzed in triplicate using the HT7900Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA). Relative expression levels were calculated according to the comparative threshold cycle method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) using *GAPDH* as an endogenous control gene and RNU48 as endogenous control miRNA. Primers and probes for expression analysis were purchased from Applied Biosystems (*MAFG*: Hs 01034678_g1; *GAPDH*: Hs03929097_g1; miRNA-7: 000268; and RNU48: 001006).

For semiquantitative RT-PCR, 500 ng of total RNA isolated from cell lines was used for RT reaction using PrimeScript RT Master (Clontech-Takara, USA) and subsequent semiquantitative PCR using Promega PCR Mix (Promega, USA) as previously described.¹⁹ Relative quantification was performed by measuring the intensity of band amplified using ImageJ software. Primers for *HMOX1* (F: 5'-TGAGTTTCAAGTATCCTTGTTGACAC-3'; R: 5'-CTTGGTCTAACTTTTGTGTGAAATAA-3'), *MAFG* (F: 5'-TCAGATTTTCAGAGGAATACCCAGCAG-3'; R: 5'-TG

ATCACCAGTCAGAAGTGTACACAC-3'), and *GAPDH* (F: 5'-GAGAGACCCTCACTGCTG-3'; R: 5'-GATGGTACATGACAAGGTGC-3') were designed to include the probe from the array in order to assure the correct transcript identification.

DNA extraction, bisulfite modification, and quantitative methylation-specific PCR. DNA from a total of 44 surgical samples from patients with NSCLC was isolated and bisulfite modified as previously described¹⁸ and was used to analyze miRNA-7 methylation status. For quantitative methylation-specific PCR, we used the primer and/or probe set to detect levels of either methylation (F: 5'-GGGTGGGGTTTTTAAAGAATC-3'; R: 5'-ACATTCTCCTCCTTCGATCG-3'; Probe: 5'-FAM-ACCCCTCTTCGTTCTCGAT-3') or unmethylation (F: 5'-GGGGTGGGGTTTTTAAAGAATT-3'; R: 5'-ATAACATTCTCCTCCTTCAATCA-3'; Probe: 5'-VIC-ACCCCTCTTCATTCTCAAT-3'). All assays were performed in duplicate using the QuantiTect Multiplex PCR Kit (Qiagen, USA) and the HT7900 Applied Biosystems. The percentage of methylation of each sample was calculated according to previously published reports.²⁰

Western blot analysis. Proteins (30 μ g) from cell lysates were resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore Ibérica SA, Madrid, Spain). Membranes were incubated with anti-Nrf2 at 1:10,000, anti-HO-1 at 1:10,000 (Abcam), and anti- β -actin at 1:100,000 (Sigma, Madrid, Spain). Peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:10,000) were used to detect proteins by enhanced chemiluminescence detected by Advance Western-blotting Detection Kit (GE Healthcare, Barcelona, Spain).

In silico databases: The Cancer Genome Atlas and Total Cancer Care. The Cancer Genome Atlas (TCGA) data: We obtained RNA sequencing data for the *MAFG* of 984 NSCLC tumors from the TCGA. The raw reads were quantified by RSEM²¹ in order to determine the read counts for each gene and miRNA (calculated separately). Then, we filtered out genes and miRNAs having less than one count-per-million reads in all samples. The normalization process was performed with trimmed mean of M values²² to obtain the *MAFG* sequence count data in all patients.

Total Cancer Care (TCC): We obtained *MAFG* gene expression data for 1035 lung cancer samples from the Moffitt Cancer Center Total Cancer Care Biorepository²³ that were assayed on a custom Affymetrix 2.0 microarray. Normalized intensity values for *MAFG* probe sets were obtained and the probe with highest average intensity was retained for gene expression analysis.

ROS measurement. H23 and/or A2780 cells were cultured in 96-well black plates at density of 10,000 cells/well. Cells were treated with 6 different doses of CDDP for 24, 48, and 72 hours. Then treatments were removed and cells were incubated with the fluorescent probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA) (10 μ M) for 45 minutes in Roswell Park Memorial Institute medium (FBS-free). Cells were washed twice with Roswell Park Memorial Institute (10% FBS), and fluorescence was recorded in a Fluostar Optima at 520 nm after excitation at 485 nm. At the end of the experiment, solutions were replaced for fresh media containing MTT (0.5 mg/mL concentration) in order to determinate viability. ROS production was calculated dividing the mean H2DCFDA fluorescence by the mean viability. Data were normalized with respect to basal conditions that were considered as 100%.

Aptamer selection for MAFG. Selection of DNA aptamers for MAFG was performed using the systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) method with several modifications. First, MAFG-Myc overexpressed in HEK293T cells were bound to Myc-agarose beads (Thermo Scientific 20168), following the supplier's instructions. The same amount of lysates from HEK293T cells transfected with empty vector was immunoprecipitated in parallel and used for the contraselection step. Synthetic random ssDNA (IBA Life Sciences, Germany), containing a central randomized region of 40 nucleotides flanked by two conserved 18-nucleotide regions in each end (RND40, 5'-GCGGATGAAGACTGGTGT-40N-GCCCTAAATAC-GAGCAAC-3') was denatured at 95°C for 10 minutes and then cooled on ice for 10 minutes. Further steps of the selection were followed as previously described with minor modifications.¹⁶ Finally, contraselection prepared as above was performed after round 2 and 5.

- **Analysis of aptamer-MAFG complexes by RT-PCR:** The aptamer populations obtained after 3 and 6 rounds of selection (SEL3MAFG and SEL6MAFG) or RND40 were incubated at 0.4 nM with 20 pmoles of MAFG bound to Myc-agarose for 1 hour at 37°C. In parallel, the same amount of each aptamer was incubated with the same volume of Myc-agarose resin without MAFG. After centrifugation at 12,000 g for 10 minutes, complexes were washed four times with 250 μ L of selection buffer and confirmation the aptamers presence was performed as described.¹⁶
- **Enzyme-linked oligonucleotide assay (ELONA):** Aptamers were labeled by PCR using 5' digoxigenin-labeled F3/5' digoxigenin-labeled R3 primers (IBA Life Sciences). To assess the enrichment of the selected population and the affinity of the individual aptamers for the target, MAFG-Myc (50 ng) was incubated with the rounds 3, 6 of aptamers or the

RND40 library, as previously described with minor modifications.¹⁶ OD405nm values were determined using a SpectraFluor microplate reader (TECAN, Barcelona, Spain).

- **Aptacytochemistry:** HEK293T cells were seeded on glass coverslips pretreated with poly-L-lysine (Sigma-Aldrich). After 16–24 hours, the cells were transfected with 0.4 μ g of MAFG-Myc plasmid using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Twenty-four hours post-transfection, the cells were fixed with cold methanol for 20 minutes at –20°C and followed incubation with aptamer populations SEL3MAFG and SEL6MAFG, as described previously.¹⁶ Colocalization was assessed by confocal microscopy using a Nikon ECLIPSE Ti-e inverted fluorescence microscope equipped with a Nikon C1 laser scanning confocal microscope system (Nikon, Tokyo, Japan) and a 60 \times oil immersion objective.
- **Aptamer cloning, sequencing, and secondary structure prediction:** The dsDNA products with “A”-overhangs from SEL6MAFG were cloned onto pGEM-T Easy-cloning vector (Promega), following the manufacturer's instructions. Individual clones were sequenced using T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') and Sp6 primers (5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3') provided by the Sequencing core. Selected ssDNA molecules were subjected to secondary structure prediction using mFold software (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Fold-Form>) 41 at 37°C in 150 mmol/L [Na⁺] and 1 mmol/L [Mg²⁺].

Aptacytochemistry and aptahistochemistry with selected dig-labeled aptamers. Following the methodology described above, H23R cells were incubated with 6 pmol of digoxigenin-labeled aptamers (IBA Life Sciences) in selection buffer for 1 hour at room temperature. Subsequently, cells were washed three times with PBS and incubated with anti-digoxigenin conjugated with 5' AlexaFluor 488 (R&D systems, USA) at 1/500 dilution in blocking buffer for 1 hour at room temperature, as secondary antibody. Finally, the cells were mounted on glass slides using glycerol-buffer containing p-phenylenediamine and 1/750 dilution of Dapi for nuclear staining. Controls were made by omitting the aptamer. Colocalization was assessed by confocal microscopy as described in (iii).

The formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections of patients with lung cancer were baked 15 minutes at 60°C. Deparaffinization was performed by two washes of xylene for 10 minutes each. Tissue sections were rehydrated by a sequential wash in 100%, 90%, 80%, and 70% ethanol and distilled water for 5 minutes each. Antigen retrieval was achieved by heat

treatment in a pressure cooker for 2 minutes in 10 mM citrate buffer (pH 6.5). Endogenous peroxidase activity of tissues was blocked with 0.3% H₂O₂. The primary binding reaction was performed with 10 pmol/mL of digoxigenin-conjugated aptamers overnight at room temperature. The secondary binding reaction was performed with anti-digoxigenin conjugated with POD (Roche; 1/200 dilution in TBS) for 45 minutes. Staining was done using the Immunoperoxidase DAB kit (Master Diagnostica), according to the manufacturer's instructions. The sections were counterstained with hematoxylin.

Cell transfection and viability assays. HEK293 and H23S/R cells were seeded into 96-well plates then transfected with 5, 12.5, 25, 75, and 100 nM of MAFG aptamers or treated with PBS-Mg using Jet Pei PolyPlus transfection reagent (PolyPlus Transfection, USA). The dose of 25 nM aptamer was afterward used in combination with increased doses of CDDP to assay viability and ROS production as described above. Viability to aptamers was assayed as previously described.²⁴ To confirm the aptamer-transfection efficiency, cells were seeded in 24-well plates for aptamer isolation and confirmation of aptamer transfection by quantitative analysis as previously described.¹⁶ A Myc-DDK-tagged ORF clone of MAFG the negative control pCMV6 were used for in transient transfection (OriGene, USA) in combination with MAFG-aptamers following the same procedure.

Statistical analysis. The data were compared using the Chi-squared test or Fisher's exact test for qualitative variables, and Student's t test or the Wilcoxon-Mann-Whitney test (non-normal distribution) for quantitative variables. Correlation of quantitative variables was analyzed by Pearson's test. For the in silico databases, the data were stratified for patients with high or low expression of MAFG according to the median of the gene expression (TCGA cutoff: 2018 counts per million; TCC cutoff: 8.70 of intensity probe). Overall survival was estimated according to the Kaplan-Meier method and compared between groups by means of the Log Rank test. All the *P* values were two sided, and the type I error was set at 5%. Statistical analyses were performed using SPSS 20 software.

RESULTS

MAFG overexpression is associated with a poor prognosis in patients with non-small-cell lung cancer. Previously published studies from our group showed that the epigenetic regulation of miR-7 through DNA methylation is a mechanism involved in platinum resistance in cancer cell lines directly regulating the action

of MAFG, which is overexpressed in resistant phenotypes.¹³ In the present study, we explored the involvement of the miR-7 and/or MAFG axis in NSCLC primary tumors. We first analyzed the quantitative DNA methylation levels of miR-7 and RNA expression levels of miR-7 and MAFG in a cohort of 22 paired samples from fresh-frozen T and ATT from patients with NSCLC (Table 1) and controls.

We observed an increase in the data dispersion in the NSCLC T samples versus the ATTs in miR-7 methylation and expression levels (Supplementary Table 1). The higher dispersion was statistically significant in both groups only when compared with saliva samples from healthy donors (*P* = 0.0002; Fig 1A and Supplementary Table 1). A negative tendency in the correlation between the percentage of methylation and expression levels of miR-7 was found only in the T samples (Fig 1B). The opposite tendency was found, toward more expression of MAFG in T samples, when the percentage of miR-7 methylation increased (Supplementary Figure 1). Neither tendency was statistically significant, probably due to the limited sample numbers; however, it is interesting to note that the two samples that showed the highest dispersion for MAFG expression presented a miR-7 methylation level over 20%.

To determine whether MAFG expression correlated with clinical outcome in patients with NSCLC, we investigated the gene expression levels in 984 patients with NSCLC from the TCGA database and 1035 patients with NSCLC from the Total Cancer Care Biorepository at the Moffitt Cancer Center. When comparing data from both data sets, we observed statistical significance according to the median level of MAFG expression; patients with low expression levels had a clearly increased overall survival compared with the group of patients with high MAFG expression levels, with *P* values of 0.020 and 0.011 for both cohorts, respectively (Fig 1C).

MAFG overexpression might induce CDDP resistance, targeting ROS. MAFG is a transcription factor involved in the detoxification of ROS, whose expression is increased in the resistant cell phenotypes H23R and A2780R, which mediates their resistance to CDDP.¹³ Thus, we explored whether MAFG influenced oxidative stress in our experimental model of paired sensitive and/or resistant cells by analyzing ROS production in cells after CDDP exposure.

First, we confirmed the response to CDDP at 24, 48, and 72 hours after exposure to the drug for both cell lines H23S and H23R. H23R cells present a resistance index >3, in accordance with our previous results²⁵ (Fig 2A). ROS levels were increased in sensitive cells after CDDP treatment compared with resistant cells, reaching 300% and 159% ROS

Table I. Clinicopathological and experimental data obtained from patients with NSCLC from La Paz University Hospital

Patient	Histology	Sex	Stage	Chemotherapy	miR-7 methylation		miR-7 expression		MAFG expression		apMAFG3F (% of PC)	apMAFG6F (% of PC)	apMAFG11F (% of PC)	Status	OS, days
					ATT (%)	T (%)	ATT ($2^{-\Delta Ct}$)	T ($2^{-\Delta Ct}$)	ATT ($2^{-\Delta Ct}$)	T ($2^{-\Delta Ct}$)					
1	Adenocarcinoma	Female	IA	No	58.49	NA	0.50	0.19	0.62	0.43	70.81	NA	79.26	Alive	2220
2	Epidermoid	Male	IB	No	5.63	5.35	1.71	2.61	0.65	0.53	84.14	90.93	27.83	Exitus	1022
3	Adenocarcinoma	Male	IB	No	14.98	13.12	1.16	0.31	0.59	0.28	NA	77.11	NA	Exitus	3
4	Adenocarcinoma	Male	NA	No	12.47	26.06	1.11	0.51	0.43	4.37	90.61	91.08	87.18	Exitus	626
5	Large Cell	Male	IIB	No	9.20	12.69	0.80	0.34	0.28	0.29	44.69	25.55	21.72	Exitus	62
6	Adenocarcinoma	Male	IIIA	Other	7.28	3.74	2.33	0.38	0.31	2.12	84.77	79.60	40.41	Exitus	228
7	Epidermoid	Female	IIIB	CDDP + Other	8.47	5.69	1.65	1.77	0.58	0.05	67.48	87.21	22.58	Exitus	109
8	Adenocarcinoma	Female	IIA	CDDP + Other	8.37	28.94	0.70	2.42	0.91	0.13	77.15	79.55	59.50	Alive	2260
9	Epidermoid	Male	IB	No	9.41	8.09	1.07	1.17	5.59	0.29	74.31	73.12	NA	Alive	1853
10	Adenocarcinoma	Male	IA	No	8.19	38.79	1.00	0.09	1.00	0.04	75.39	69.14	74.06	Exitus	216
11	Adenocarcinoma	Female	IIIA	CBDCA + Other	6.51	6.08	0.99	5.83	1.91	0.20	53.02	35.66	68.15	Alive	2192
12	Epidermoid	Male	IB	CDDP + Other	7.59	30.28	0.92	0.75	2.24	0.81	77.27	92.45	NA	Alive	2341
13	Epidermoid	Male	IIA	No	12.44	NA	0.77	1.51	0.70	0.09	88.89	84.07	75.52	Exitus	289
14	Epidermoid	Male	IIA	No	12.66	10.98	2.21	2.07	0.73	0.84	90.76	96.88	NA	NA	109
15	Adenocarcinoma	Female	IIIA	CDDP + Other	4.72	3.57	0.73	0.32	0.76	0.49	NA	NA	NA	Alive	2228
16	Adenocarcinoma	Male	IIB	Other	35.35	10.00	0.80	0.31	1.03	0.78	75.77	95.65	94.51	Exitus	888
17	Epidermoid	Male	IIB	CBDCA + Other	8.24	53.19	1.35	1.05	0.57	0.03	74.61	28.90	44.30	Exitus	259
18	Adenocarcinoma	Female	IB	CDDP + Other	10.29	9.42	1.19	2.86	0.38	1.52	95.72	93.75	87.23	Exitus	936
19	Epidermoid	Male	IIB	CDDP + Other	13.67	9.52	1.50	2.87	0.99	0.50	NA	NA	NA	Exitus	1224
20	Epidermoid	Male	IIIB	CBDCA + Other	4.06	13.45	0.80	1.33	0.22	0.43	85.99	NA	2.24	Exitus	603
21	Adenocarcinoma	Male	IIIA	CDDP + Other	9.55	63.07	1.14	0.65	1.11	2.57	NA	67.21	71.08	NA	421
22	Adenocarcinoma	Female	IIB	CDDP + Other	4.43	6.84	0.50	2.07	0.26	2.35	80.30	92.55	78.10	NA	184

Abbreviations: ATT: adjacent tumor tissue; CBDCA: carboplatin; CDDP: cisplatin; NA: not available; NSCLC: non-small cell lung cancer; OS, Overall Survival; % of PC: % of Positive Cells; T: tumor.

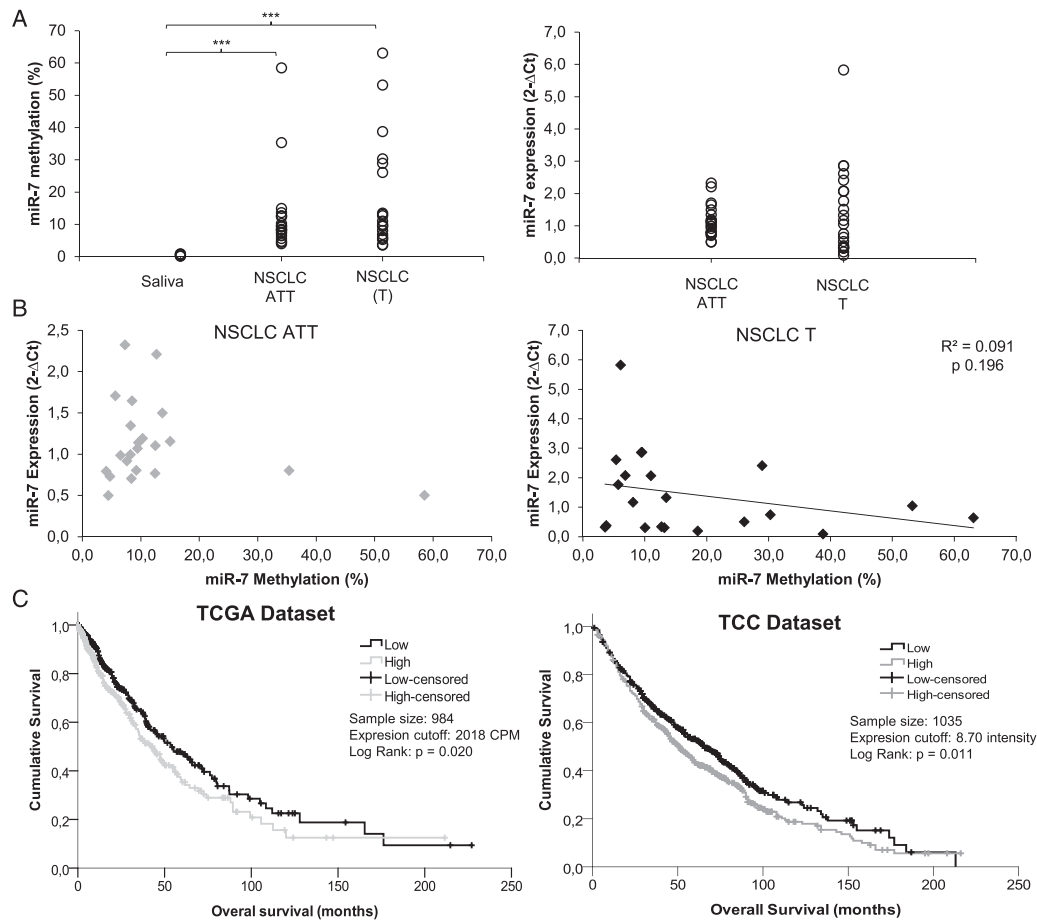


Fig 1. Involvement of miR-7 and MAFG in patients with NSCLC. (A-B) Assessment of miR-7 methylation levels measured by qMSP and expression levels of miR-7 measured by qRT-PCR in fresh samples from a cohort of 22 patients with NSCLC; (A) Left, quantitative methylation percentage of miR-7; right, miR-7 expression levels in 44 paired samples (ATT and T); (B) Correlation between the methylation percentage of miR-7 and expression levels of miR-7. For all the analyses, data represent the percentage of methylation according to a previous report²⁰ and expression levels in 2^{-ΔCt}; (C) Analysis of mRNA expression of MAFG in two in silico cohorts of patients with NSCLC. Survival analysis in 984 (left panel) and 1035 (right panel) NSCLC samples from the TCGA and TCC, respectively. LogRank test was used for comparisons and $P < 0.05$ was considered as a significant change in OS. NSCLC, non-small cell lung cancer; ATT, adjacent tumor tissue; T, tumor; CPM, counts per million; TCGA, The Cancer Genome Atlas; TCC, Total Cancer Care. *** $P < 0.001$

production at 3.00 $\mu\text{g/mL}$ CDDP, respectively, versus basal untreated cells, $P < 0.001$ (Fig 2B). The response to CDDP and the differences in ROS production between sensitive and resistant cells were also confirmed in A2780S/R ovarian cancer cell lines (Supplementary Figure 2A), in which we observed an effect of CDDP treatment after 48 hour of exposure, consistent with previous reports.¹³ Moreover, we found that the expression of ROS-detoxifying genes, such as *HMOX1*, *NQO1*, *GSTO2*, or *GPX7* (Supplementary Table 2), was upregulated in these resistant cell lines ($P < 0.05$), according to our reported arrays under the same previously defined bioinformatics and statistical criteria¹³ (GEO GSE84201). We selected *HMOX1* and *NRF2* for semiquantitative RT-PCR

expression pattern validation, because of their close relationship with MAFG action in the detoxification process. *NRF2* expression did not changed after CDDP treatment; however, the resistant cells showed higher protein levels of *NRF2*, and it was also observed a slight increase in *HMOX1* levels (Fig 2C, D and Supplementary Figure 2B). In addition, we observed a direct relationship between the expression of MAFG and the Resistance Index in all our lung cancer cell lines (Supplementary Figure 2C).

Identification of aptamers binding MAFG. Aptamers were selected from libraries of oligonucleotides by iterative cycles of selection (SELEX methodology). We performed 6 rounds of selection and 2 contraselection rounds (after rounds 2 and 5), using a Myc agarose

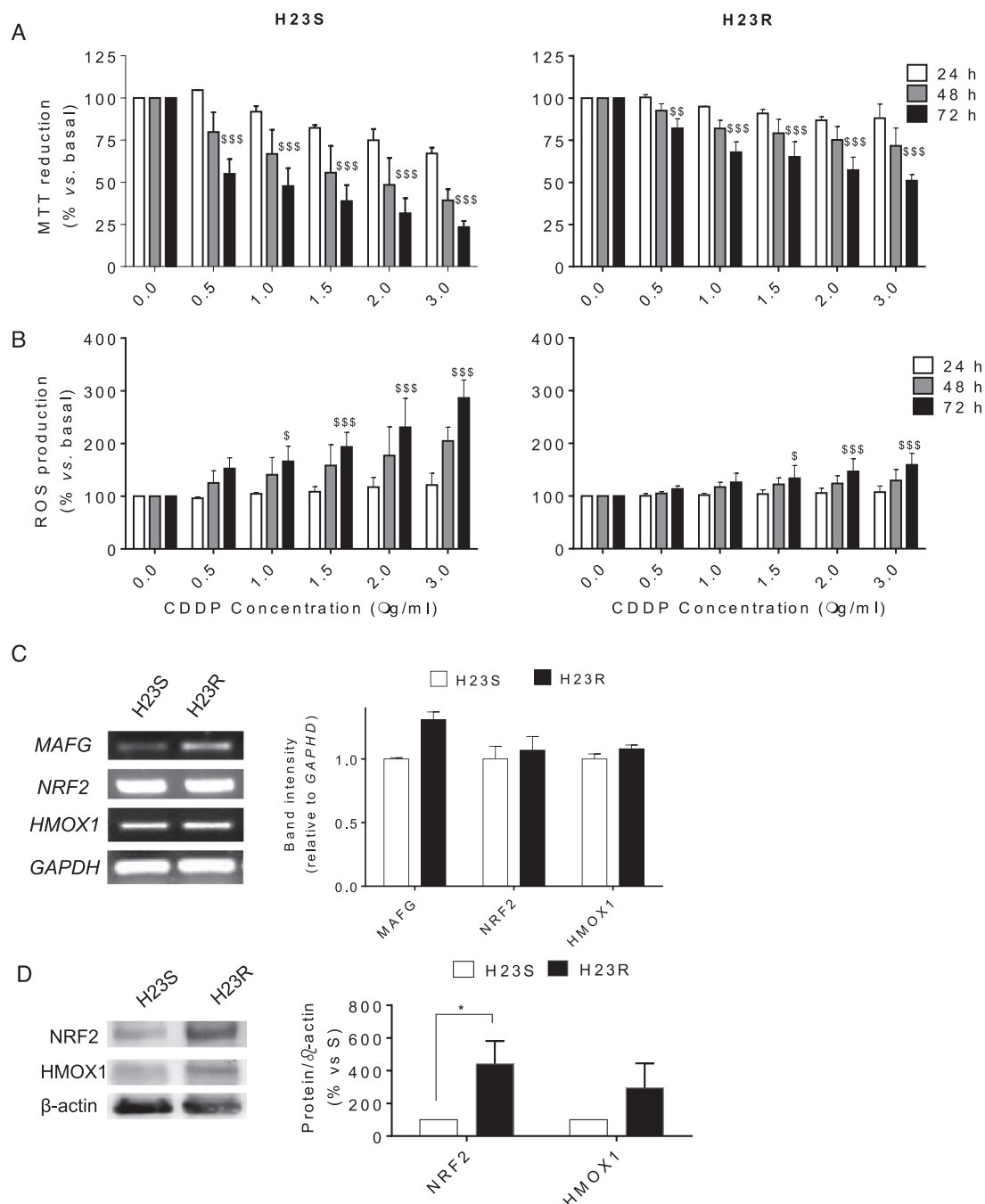


Fig 2. Viability assays and reactive oxygen species detection after CDDP treatment in H23 cell lines. (A) Viability to CDDP in H23S (left) and H23R (right) at 24, 48, and 72 hours and 6 concentrations of CDDP measured by MTT assay; (B) Increment of ROS production in H23S (left) and H23R (right) after 24, 48, and 72 hours of CDDP treatment; For (A) and (B), bars represent the mean of at least two independent experiments measured by duplicate \pm SD. $\$$: $P \leq 0.05$ versus basal; $\$$ $\$$: $P \leq 0.01$ versus basal; $\$$ $\$$ $\$$: $P \leq 0.001$ were considered as significant change in CDDP resistance and ROS production; (C) Semiquantitative mRNA expression analysis of downstream genes involved in ROS detoxification regulated by MAFG, which showed expression changes for H23 in the microarray data (GSE84201,¹³) (left panel). Representative images of *MAFG* and *HMOX1* RT-PCR comparing sensitive and resistant subtypes. Each assay was performed at least three times to confirm the results. (Right panel) Relative intensity quantification of the amplified band for each gene measured by ImageJ Software. Bars represent the mean of the three independent experiments using the intensity of *GAPDH* as endogenous control and the sensitive subtype of each cell line as calibrator. (D) Immunoblots of *HMOX1*, *NRF2*, and β -actin. Images correspond to a representative experiment that was repeated four times with similar results. Scion Image program was used to quantify band intensities corresponding to immunoblot detection of protein samples. CDDP, cisplatin; MAFG, musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein G.

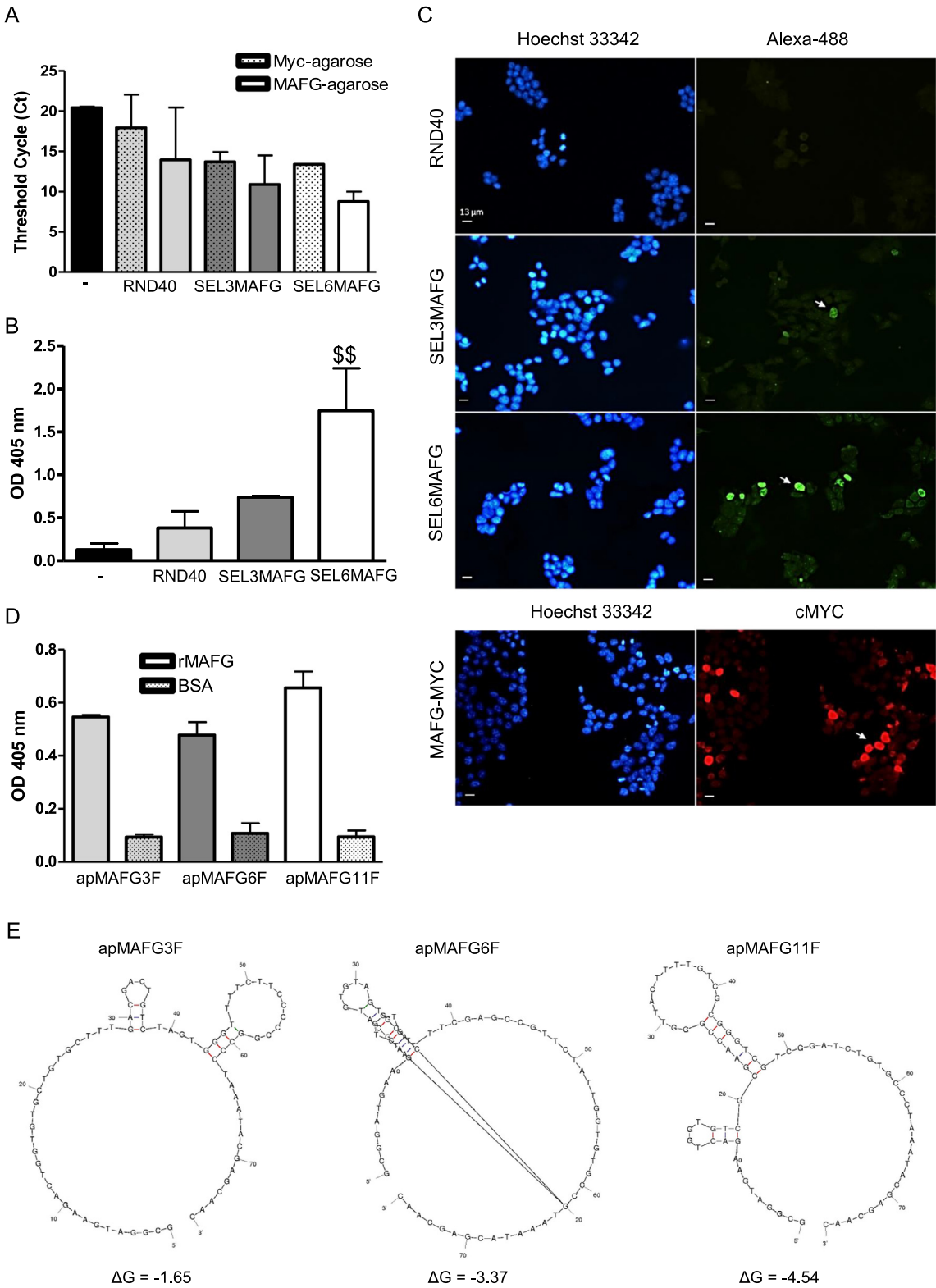
resin that binds the MAFG-Myc protein overexpressed in HEK293T cells. To assess the enrichment and the affinity of the population obtained after successive rounds of selection, we performed three types of assays: (i) analysis of aptamer-MAFG complexes by RT-PCR, (ii) ELONA assays, and (iii) aptacytochemistry. Quantitative PCR assays were performed using aptamers that bind to MAFG-resin complexes as a template. These assays allowed us to confirm that the selected aptamers were specific against the target and not the Myc-agarose resin. The amount of aptamers recovered in the presence of MAFG was 3 Cts lower than in that of the RND40 and SEL3MAFG population, whereas SEL6MAFG was 4.5 Cts lower in the presence of MAFG (Fig 3A), indicating a higher amount of aptamers bound in this round. In addition, ELONA assays showed a statistically significant increase in the signal of the population obtained after round 6 relative to round 3 or to the initial RND40 population (Fig 3B). Finally, we studied the capacity of the aptamer population of each round to recognize overexpressed MAFG in the cells by aptacytochemistry. For this purpose, HEK293T cells transiently transfected with MAFG-Myc were incubated with the initial RND40 population or with that of round 3 or round 6, labeled with Alexa-488. The results obtained by fluorescence microscopy indicated that RND40 showed a very low signal with a diffuse cytoplasmic pattern, whereas SEL3MAFG and most prominently SEL6MAFG aptamers showed a high nuclear signal in several cells. This pattern was very similar to that obtained by incubation with the Myc antibody (Fig 3C). In view of these results, we cloned and sequenced the SEL6MAFG population and identified three sequences (apMAFG3F, apMAFG6F, and apMAFG11F) with high binding capacity to the target in the nanomolar range, reaching values of four times that of the BSA protein (Fig 3D and Supplementary Table 4). To predict the most stable secondary structures of the MAFG aptamers, we performed a bioinformatic analysis of their sequences using mFold software. Fig 3E illustrates the most probable secondary structures of these aptamers, taking into account the lower free energy (ΔG).

MAFG aptamers can be used to detect MAFG levels in NSCLC samples. We next performed aptacytochemistry on H23S and H23R cells with the individual digoxigenin-labeled aptamers apMAFG3F, apMAFG6F, and apMAFG11F. We observed that individual aptamers were more present in H23R cells than in H23S, mostly in the nuclei of the cells and specifically accumulated in quantifiable dots (Fig 4), according to the cellular localization of MAFG. Quantification of the number of dots per nucleus showed remarkable differences between

H23R and H23S for apMAFG3F and apMAFG6F, whereas no differences were observed for apMAFG11F (Supplementary Figure 3). Interestingly, apMAFG3F was also present in the cytoplasm, whereas apMAFG6F was preferentially located at the nuclei.

We then took advantage of the aptacytochemistry to perform an aptamer-based histochemistry in 20 tumor samples from our cohort of patients with known mRNA levels of MAFG. We found that aptamers were able to identify MAFG in the nucleus of various cell types with differential staining intensity between the tumors (Fig 5A). To determine the correlation between the aptahistochemistry and the mRNA levels of MAFG, we calculated the percentage of cells with positive staining from the total number of cells computed at four different areas randomly selected for each sample. We observed that classifying the patients according to their MAFG expression levels, those samples with higher MAFG levels presented a significant increment in the percentage of positive cells after aptahistochemistry staining with both apMAFG3F and apMAFG6F ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, T test, respectively; Fig 5B).

apMAFG6F increases ROS production and restores cell sensitivity to CDDP. To gain insight into the biological effect of the identified aptamers and to optimize the dose for a functional analysis, we worked with the normal cell line HEK293T and the sensitive and resistant phenotypes of the lung cancer cell lines H23S/R. MAFG aptamer transfection induced similar mortality curves in the cancer cell lines, while it appeared to induce less toxicity in HEK293T, which showed better viability curves for the three aptamers tested (Supplementary Figure 4A). Concentrations higher than 25 nM induced a high mortality rate in all the cells tested, and the same effect was also observed when two intermediate doses selected between the 25 nM and 75 nM concentrations were tested in H23R (Supplementary Figure 4B). The 25 nM concentration was chosen for functional analysis because it is the minimal dose that exerts an effect on viability of tumor cells but not normal cells. The efficiency of aptamer transfection at this dose was confirmed by quantitative PCR (Supplementary Figure 4C). We next tested the specificity of the aptamers for rescuing the sensitivity to CDDP. Aptamer apMAFG6F decreased the CDDP resistance at 25 nM (resistance index 2.63 vs 2.0), whereas no changes were observed for aptamers apMAFG3F or apMAFG11F (Fig 6A). We confirmed these results in H1299, an additional lung cancer tumor cell line highly resistant to CDDP with an IC₅₀ of 10 $\mu\text{g/mL}$ (Fig 6B). In fact, we verified the ability of apMAFG6F to increase CDDP sensitivity in H1299, as we observed a



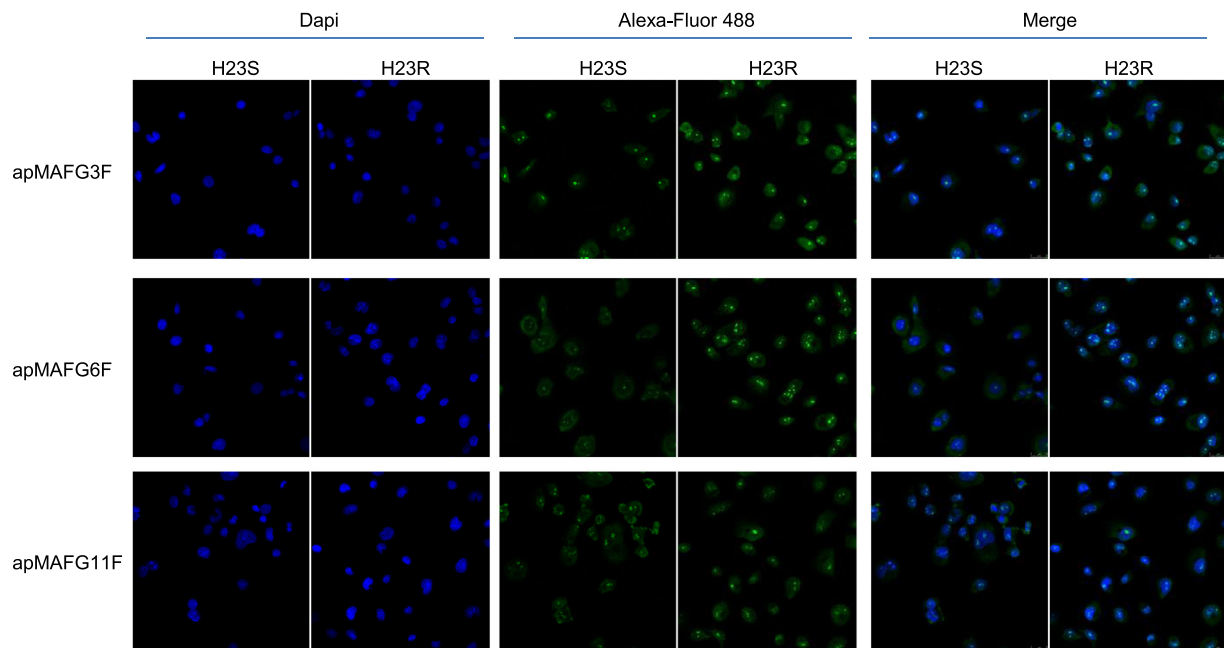


Fig 4. MAFG localization pattern in H23S and H23R cells measured by aptacytochemistry. Cells were incubated using digoxigenin-labeled aptamers apMAFG3F, apMAFG6F, and apMAFG11F as primary recognition molecule and Alexafluor 488-conjugated anti-digoxigenin as secondary antibody. Confocal microscopy images corresponding to the staining of nuclei with Dapi (blue), aptamers (green) and merge are shown. Bar = 25 μ m. MAFG, musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein G.

decrease in the IC₅₀ to 4.5 μ g/mL platinum in comparison with the untransfected cell line. This increase in sensitivity to the drug was accompanied by a decrease in *MAFG* and *HMOX1* expression in the cells carrying apMAFG6F (Supplementary Figure 4D). In addition, we overexpressed MAFG in H23S cells as we have done previously¹³ and combine the overexpression with apMAFG6F, which rescued the phenotype and resensitized the cells (Fig 6C). We also confirmed the success of the overexpression and aptamer transfection by qRT-PCR (Fig 6D).

To ultimately confirm that apMAFG6F was restoring CDDP sensitivity in H23R cells by acting on the ROS, we measured ROS production after combining aptamer transfection and CDDP treatment. We observed a linear dose-response relationship between increasing amounts of CDDP and the production of ROS at 4 μ g/mL of CDDP ($P < 0.005$) in the resistant cells carrying the apMAFG6F compared with the untransfected cells. This result was also consistent with the decrease in cell viability that we also measured in parallel in this experiment (Fig 7A). Semiquantitative

Fig 3. Analysis of the affinity of the aptamers against MAFG. (A) Quantification of aptamer-MAFG complexes by qPCR comparing absence (dot pattern) or presence (filled pattern) of MAFG protein. Figure shows the differences in Threshold Cycle (Ct) between the library RND40 and the selection rounds 3 (SEL3MAFG) and 6 (SEL6MAFG). Bars represent the mean \pm SEM of 2–3 experiments; (B) Specificity binding assay of aptamers to MAFG performed by ELONA. MAFG-Myc was plated at 50 ng/well in 96-well plates followed by incubation with 5' digoxigenin-labeled aptamers from RND40, SEL3MAFG, and SEL6MAFG. The figure represents the mean \pm SEM of three independent experiments. \$\$: $P < 0.01$; (C) Aptacytochemistry in HEK-293T cells transiently transfected with MAFG-Myc. Cells overexpressing MAFG were incubated with 5' Alexafluor 488-conjugated aptamers from RND40, SEL3MAFG, or SEL6MAFG (upper panel) or Myc antibody (lower panel). Fluorescence microscopy images corresponding to the staining of nuclei with Hoechst (blue), antibodies (red), and aptamers (green) are shown. Arrowhead indicates positive cells. Bar = 13 μ m; (D) Study of individual aptamer affinity performed by ELONA. Recombinant MAFG was plated at 50 ng/well in 96-well plates followed by incubation with 5' digoxigenin-labeled individual aptamers apMAFG3F, apMAFG6F, and apMAFG11F. The figure represents the mean \pm SEM of two independent experiments; (E) Secondary structures of aptamers apMAFG3F, apMAFG6F, and apMAFG11F obtained by bioinformatics sequence analysis using the mFold software taking into account the lower free energy (ΔG). MAFG, musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein G; ELONA, enzyme-linked oligonucleotide assay.

RT-PCR of *MAFG* and *HMOX1* showed a decrease in their expression in aptamer-transfected H23R cells after platinum treatment compared with H23R (Fig 7B).

DISCUSSION

The study of epigenetic, transcriptional, and post-transcriptional regulatory mechanisms of genes and miRNAs will help to elucidate key players involved in resistance to chemotherapy drugs. Current treatments may be improved and new ones developed based on the genetic and epigenetic profiles of various cancer patients, thus leading to personalized therapies. The search for new biomarkers for survival, prognosis, and drug-resistance in cancer is a wide-open field for exploration and investigation. In fact, despite significant scientific effort in recent decades, we have not yet overcome the strategic challenge of restoring sensitivity to platinum-derived drugs that are still the paradigm treatment for many malignancies, including lung cancer.

For NSCLC, differential expressions have been reported for several miRNAs, such as miR-200c in NSCLC cell lines,²⁶ or miR-138 in the A549 CDDP-resistant subtype cell line, in comparison with the parental A549 and how their enhanced expression increased the response to CDDP.²⁷ However, there are very few studies linking the role of miRNA methylation with tumor development or clinical outcomes such as miR-34a.^{28,29} We have previously reported that hypermethylation of regulatory regions of miR-7s may predict relapse in platinum-treated patients with ovarian cancer. We intended first to deepen our understanding of this aspect in a cohort of 22 paired samples from patients with NSCLC. We found similar methylation levels of miR-7 in tumor samples and in normal adjacent tissues, and no association of methylation levels with therapy response or overall survival. We observed, however, a higher dispersion of methylation and expression of miR-7 and *MAFG* in the T than in the ATT and in the control samples, suggesting that different molecular changes in miR-7 and *MAFG* could be mediating the carcinogenic process, as has been observed for other markers.³⁰ We have not specifically observed clear differences either in methylation or expression of any candidate in NSCLC T versus ATT samples, which could indicate that the samples adjacent to the tumor have already acquired molecular changes probably associated with tumor features as has been described for other miRNAs.³¹

Moreover, the methylation analysis of the ATT compared with the five normal saliva samples indicates that

the methylation of this miRNA is an event that occurs in the early stages of the disease. This fact suggests that molecular changes such as miR-7 methylation within the tumor tissue and surrounding tissue generate the microenvironment necessary for tumor cells to grow, and this event could be involved not only in tumorigenesis but also in other malignancies associated with smoking.^{32,33} We could not find a clear correlation in either methylation or miR-7 and *MAFG* expressions in NSCLC T samples. Although these results are not as compelling as previously observed with our in vitro models (ref theranostics), we cannot dismiss the potential coregulation of epigenetic factors that can interact with miR-7 and *MAFG*, like lncRNAs that regulate miR-7 (*CDR1AS*), and *MAFG* expression (*MAFGAS1*) in a more complex dynamic environment like the human body. A strength of the current study is that the results are based on an analysis of fresh tissues from patients with NSCLC, whereas most of the data in the literature report the expression of miRNAs and candidate genes from culture cell lines. In accordance with our “in house” results, we observed a significant relationship between the expression of *MAFG* and survival in our additional large cohort of 1035 patients analyzed from Moffitt Center and in the public database with 984 from TCGA with a clear trend toward higher overall survival when *MAFG* expression is low. This suggests an oncogenic role of *MAFG* in lung cancer, supporting its potential as a prognostic biomarker.

The mechanistic approach we used in this study was aimed at directly linking the development of in vitro CDDP resistance with the overexpression of *MAFG* through the decrease of ROS production in our model of cancer cell lines. It has previously been shown that the resistance to CDDP in the A2780 cell line is an event caused by overactivation of the redox-detoxifying pathway.³⁴ In line with these, the results obtained with the ROS production assay in our experimental models indicate that CDDP-resistant subtypes have a lesser increase in ROS after CDDP exposure, probably due to its ability to detoxify the oxidative stress produced by the drug, as a consequence of an overexpression of *MAFG*. We also found a significant overexpression of reported redox–detoxifying-related genes³⁵ in the resistant cell lines harboring an increased expression of *MAFG*, reinforcing the idea that *MAFG* mediates the resistance to CDDP through the modulation of ROS. Indeed, our results also indicate that *MAFG* could regulate this process in response to CDDP by increasing NRF2 stabilization in the nucleus. Therefore, targeting *MAFG* may lower NRF2 activity and potentially restore the sensitivity to the drug.

We then sought to explore new methodologies to detect and inhibit the action of *MAFG* in order to

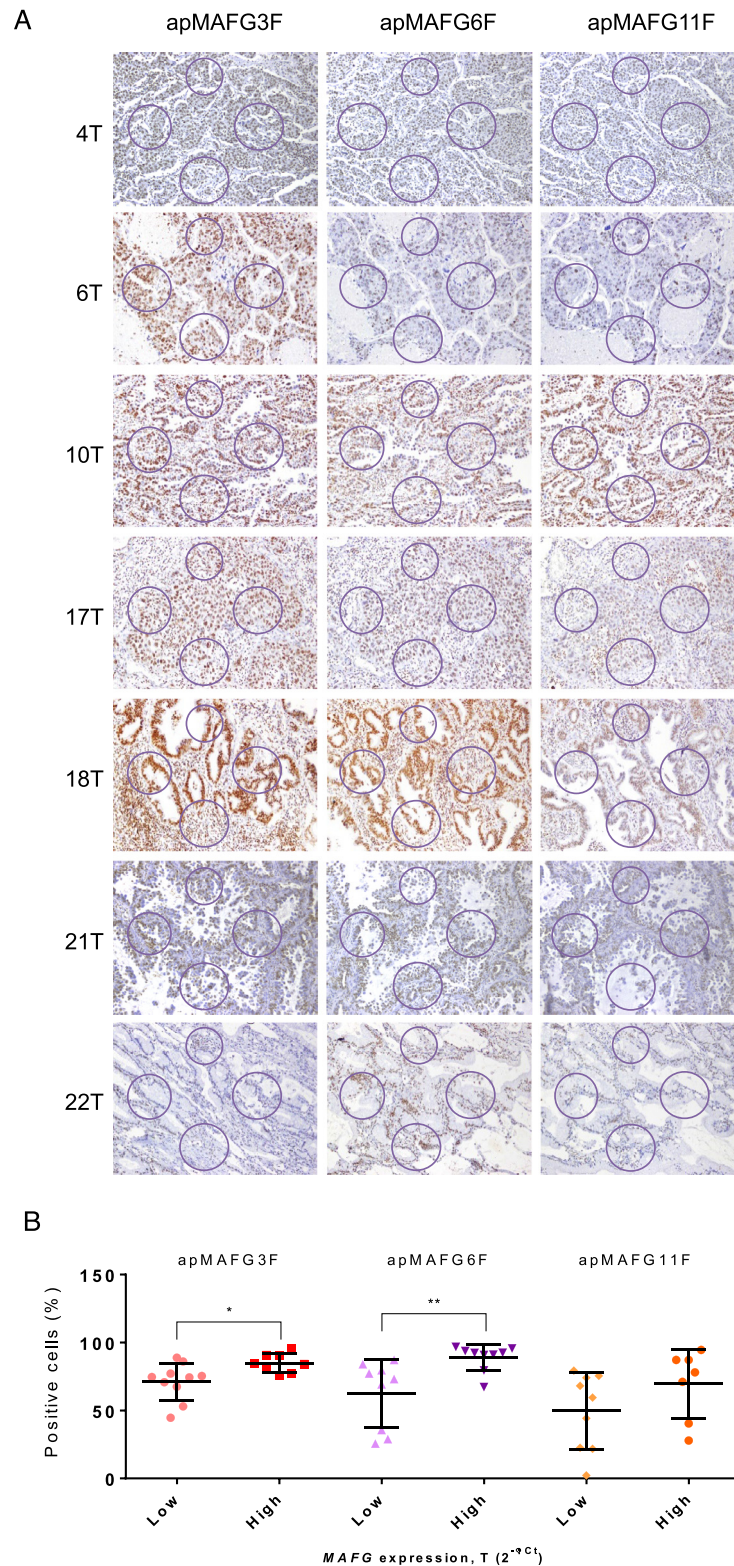


Fig 5. Analysis of MAFG localization pattern in paraffin samples of patients with known levels of MAFG by aptahistochemistry. Samples were incubated with digoxigenin-labeled aptamers apMAFG3F, apMAFG6F, and apMAFG11F as primary recognition molecules, and afterward with anti-digoxigenin antibodies. Staining was performed using DAB staining solution. (A) Representative aptahistochemistry pictures showing the areas of analysis in NSCLC tumor samples; (B) T test comparison between low and high MAFG mRNA levels ($2^{-\Delta C_t}$) and the % mean ratio of positive cells analyzed in the areas defined on (A). Positive cells were counted using the Cell Counter on ImageJ software. NSCLC: non-small cell lung cancer. MAFG, musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein G.

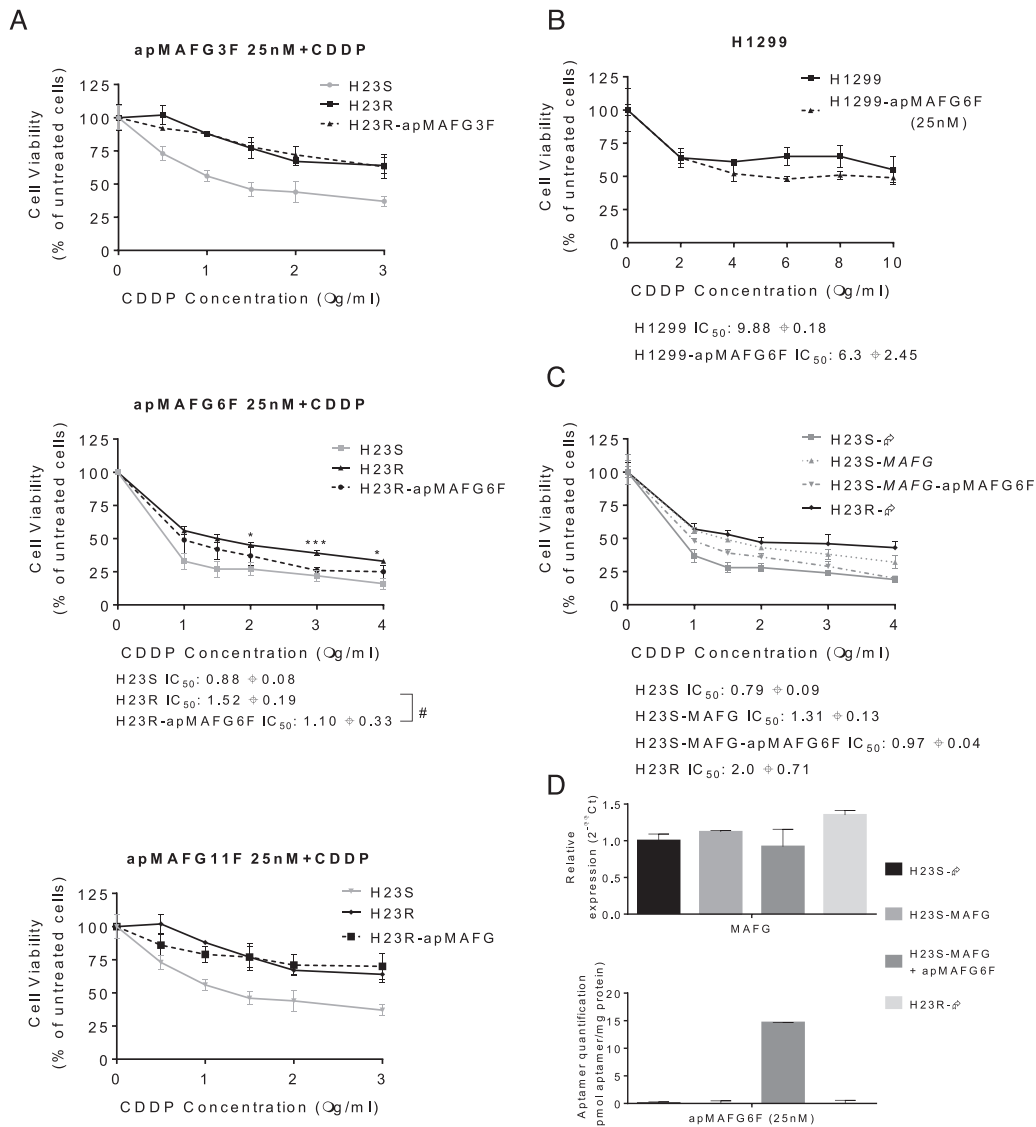


Fig 6. Effect of aptamers apMAFG3F, apMAFG6F, and apMAFG11F on cell viability, response to CDDP. (A) Viability curves combining the selected dose of aptamers (25 nM) and increasing doses of CDDP in H23S/R cells. # $P < 0.05$ (Student's t test). The treatment with aptamer significantly increased the sensitivity to CDDP (* $P < 0.05$ and *** < 0.001); (B) Viability curves combining apMAFG6F at 25 nM with increasing doses of CDDP in H1299 lung cancer cells. (C) Viability curves of H23 cell line transfected with pCMV6 (S-∅ and R-∅), with the overexpression vectors (S-MAFG) and the combination of MAFG overexpressing plasmids together with apMAFG6F at 25 nM. For (A), (B), and (C), each experimental group was exposed for 72 h to 6 different CDDP concentrations after aptamer transfection; data were normalized to each untreated control, set to 100% and represent the mean ± SD of at least three independent experiments performed in quadruplicate at each drug concentration for each cell line analyzed. The CDDP-RI (Resistant Index to CDDP) was calculated as "IC₅₀ from the Resistant/ IC₅₀ from the Sensitive" and "IC₅₀ from the transfected with aptamers or MAFG/ IC₅₀ from the Sensitive" ± SD. (D) Validation of MAFG overexpression and aptamer transfection in the H23S cells after 72 h of transfection. Top, Relative expression levels of MAFG measured by quantitative RT-PCR, in the cell line H23, represented in 2^{-ΔΔCt} scale; In each experimental group, the sensitive cell line transfected with pCMV6 plasmid was used as a calibrator. Each bar represents the combined relative expression of two independent experiments measured in triplicate. Bottom, quantification of apMAFG6F in the cell line H23. Quantification was performed according to the absolute quantification method by using a standard curve of known concentration of aptamers. The amount of protein per sample was used as a control. Data represent the mean of at least three independent experiments measured by triplicate ± SD. CDDP, cisplatin; RT-PCR, real-time polymerase chain reaction.

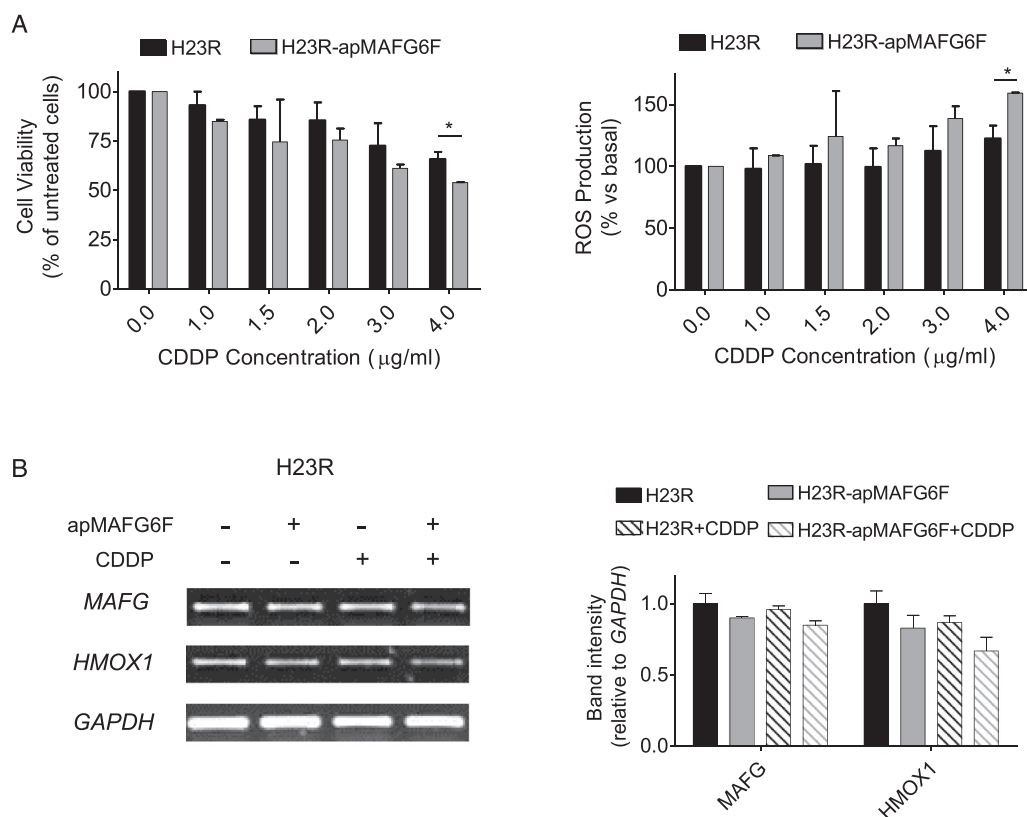


Fig 7. Effect of aptamer apMAFG6F on response to CDDP and ROS production. (A) Viability and ROS production assay in H23R cells after apMAFG6F transfection. Each experimental group was exposed for 72 h to 6 different CDDP concentrations, and data were normalized to each untreated control, set to 100%. The data represent the mean \pm SD of at least four independent experiments performed in duplicate at each drug concentration for each cell line analyzed. * $P < 0.05$ was considered as significant change in CDDP resistance and ROS production; (B) Expression analysis of downstream genes regulated by MAFG involved in ROS detoxification in H23R and H23R transfected with apMAFG6F. Left, representative images of *MAFG*, *HMOX1*, and *GAPDH* RT-PCR. Each assay was performed at least three times to confirm the results. Right, relative intensity quantification of the amplified band for each gene measured by ImageJ Software. Bars represent the mean of three independent experiments using the intensity of *GAPDH* as endogenous control and the resistant subtype of each cell line as calibrator \pm SD. CDDP, cisplatin; ROS, reactive oxygen species; MAFG, musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein G.

resensitize cancer cells to CDDP. Aptamers constitute a novel field of research, which has led to important achievements in therapeutics and diagnosis.^{14,36} Therefore, in this study, we aimed to select and characterize aptamers that are highly specific against MAFG and that could show potential therapeutic and/or diagnostic properties in cancer, as has been shown for other aptamers.^{15,37} The SELEX technology allowed us to select and identify three aptamers with high affinity to MAFG after 6 rounds of selection. Although the three selected aptamers (apMAFG3F, apMAFG6F, and apMAFG11F) showed high affinity to the protein with Kd values in the nanomolar range, apMAFG3F and apMAFG6F showed the lower Kd and the highest signal in resistant cells in aptacytochemistry. The fact that apMAFG6F staining remains preferentially at the nuclei could indicate that it is, in essence, more specific for nuclear MAFG. In addition, we observed a greater

presence of the three aptamers in H23R cells, suggesting greater expression of the protein MAFG in resistant cells; indeed, this result is in accordance with the high mRNA levels of MAFG observed in the resistant cancer cells.¹³ We were also able to detect MAFG in human formalin-fixed paraffin-embedded tumor samples with known levels of *MAFG* mRNA. Specifically, we found the strongest difference between low and high expression levels of *MAFG* when using apMAFG6F staining in the group of samples analyzed. These results, although preliminary because of the limited number of samples tested, are promising, indicating that these aptamers, particularly apMAFG6F, could be used as potential diagnostic tools to identify patients with higher expression of MAFG. It is a robust starting point for future studies involving larger cohorts of patients to analyze the correlation between aptamer intensity and patients' clinical outcome.

As expected, the combination of aptamers apMAFG3F, apMAFG6F, and apMAFG11F and CDDP treatment in resistant lung cancer cells showed that only apMAFG6F can change the response to CDDP, partially restoring the sensitivity to the drug, without causing cell mortality in normal cells. In fact, even when *MAFG* was overexpressed, inducing an increase of platinum resistance in H23 sensitive cells, apMAFG6F was able to revert the resistance to platinum. This resensitization was promoted by an increase in ROS production, probably mediated by a decrease in the expression of antioxidant genes such as *HMOX1*, as previously shown.^{38–40} We also observed a decrease in *MAFG* expression levels when transfecting apMAFG6F, which suggests an auto-regulation of *MAFG* transcription and is consistent with the fact that *MAFG* shows ARE motifs on its regulatory region.^{10,41} Therefore, our results present a new mechanism for restoring CDDP sensitivity in lung cancer through the use of aptamer apMAFG6F.

Taken together, our experimental results strongly support the role of *MAFG* in the development of CDDP resistance through ROS detoxification. To the best of our knowledge, this is the first report describing the possible role of *MAFG* expression as a biomarker of poor prognosis in NSCLC and its potential as a therapeutic and diagnostic target in cancer and other pathologies through the use of aptamers.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Hayley Pickett ServingMed.com for the English language correction. The authors also acknowledge Biobank from HULP for sample processing.

Conflicts of Interest: All the authors have read the journal's authorship statement and have no conflicts of interest to declare. The information provided in this study is included in a patent application process (EP17382610.8) and therefore it must be treated, solely and exclusively, based on the purposes of this paper, and should not be published if it does not respond to the purpose thereof. This application and its contents are protected by the Spanish Law on Intellectual and Industrial Property, prohibiting the distribution, reproduction, disclosure, transformation and sale of the entire document or part thereof, as well as the use, under any circumstances, of the trademarks appearing therein, without the prior express written consent of the Foundation for Biomedical Research of La Paz University Hospital-IdiPAZ (FIBHULP), which holds the ownership.

Author contributions are as follows: IIC: Conception and design; OV, CRA, ASF, PM, OP, AGG, RL, MEM, VMG and SS: development of methodology; OV, CRA, ASF, PM, OP, MEM, SS and BMR: acquisition of data; OV, CRA, ASF, PM, OP, MEM, BMR, IER, RL, TAS, VMG and IIC: analysis and interpretation of data; CRA and BMR: bioinformatical analysis. All authors wrote, reviewed and/or revised the manuscript.

Financial support: This study was supported by the “Fondo de Investigación Sanitaria-Instituto de Salud Carlos III” [PI15/00186 and CP 08/000689 to I.I.C.]; and the European Regional Development Fund/European Social Fund FIS [FEDER/FSE, Una Manera de Hacer Europa]. MINECO funds support O.V., C.R.A. and O.P. contracts through RTC-2015-4362-1 and RTC-2016-5314-1 projects.

Authorship agreement: We declare that all authors have read the journal's authorship agreement.

Supplementary Data

Supplementary data associated with this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.06.005>.

REFERENCES

- Haslehurst AM, Koti M, Dharsee M, et al. EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer. *BMC Cancer* 2012;12:91.
- Karaca B, Atmaca H, Bozkurt E, et al. Combination of AT-101/ cisplatin overcomes chemoresistance by inducing apoptosis and modulating epigenetics in human ovarian cancer cells. *Mol Biol Rep* 40:3925–33.
- Deavall DG, Martin EA, Horner JM, Roberts R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J Toxicol* 2012;2012:645460.
- Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, et al. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2007;9:49–89.
- Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 2012;31:1869–83.
- Kilic U, Kilic E, Tuzcu Z, et al. Melatonin suppresses cisplatin-induced nephrotoxicity via activation of Nrf-2/HO-1 pathway. *Nutr Metab (Lond)* 10:7.
- Katsuoka F, Motohashi H, Engel JD, Yamamoto M. Nrf2 transcriptionally activates the mafG gene through an antioxidant response element. *J Biol Chem* 2005;280:4483–90.
- Motohashi H, Katsuoka F, Miyoshi C, et al. MafG sumoylation is required for active transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 2006;26:4652–63.
- Li W, Yu S, Liu T, et al. Heterodimerization with small Maf proteins enhances nuclear retention of Nrf2 via masking the NESZip motif. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783:1847–56.
- Hirotsu Y, Katsuoka F, Funayama R, et al. Nrf2-MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks. *Nucleic Acids Res* 2012;40:10228–39.
- de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Ahn H, et al. MAFG is a transcriptional repressor of bile acid synthesis and metabolism. *Cell metabolism* 2015;21:298–310.
- Katsuoka F, Yamamoto M. Small Maf proteins (MafF, MafG, MafK): history, structure and function. *Gene* 2016;586:197–205.
- Vera O, Jimenez J, Pernia O, et al. DNA Methylation of miR-7 is a Mechanism Involved in Platinum Response through MAFG Overexpression in Cancer Cells. *Theranostics* 2017;7:4118–34.
- Chakravarthy U, Adamis AP, Cunningham Jr. ET, et al. Year 2 efficacy results of 2 randomized controlled clinical trials of pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2006;113:e1–25.
- Bates PJ, Laber DA, Miller DM, Thomas SD, Trent JO. Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Experimental and molecular pathology* 2009;86:151–64.

16. Garcia-Recio EM, Pinto-Diez C, Perez-Morgado MI, et al. Characterization of MNK1b DNA aptamers that inhibit proliferation in MDA-MB231 breast cancer cells. *Molecular therapy Nucleic acids* 2016;5:e275.
17. Ibanez de Caceres I, Cortes-Sempere M, Moratilla C, et al. IGFBP-3 hypermethylation-derived deficiency mediates cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Oncogene*.29:1681–90.
18. Ibanez de Caceres I, Dulaimi E, Hoffman AM, Al-Saleem T, Uzzo RG, Cairns P. Identification of novel target genes by an epigenetic reactivation screen of renal cancer. *Cancer Res* 2006;66:5021–8.
19. Vera O, Rodriguez-Antolin C, de Castro J, Karreth FA, Sellers TA, de Caceres II. An epigenomic approach to identifying differential overlapping and cis-acting lncRNAs in cisplatin-resistant cancer cells. *Epigenetics* 2018: 01–30.
20. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000;28:E32.
21. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics* 2011;12:323.
22. Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome biology* 2010;11:R25.
23. Fenstermacher DA, Wenham RM, Rollison DE, Dalton WS. Implementing personalized medicine in a cancer center. *Cancer journal* 2011;17:528–36.
24. Chattopadhyay S, Machado-Pinilla R, Manguan-Garcia C, et al. MKP1/CL100 controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 2006;25:3335–45.
25. Ibanez de Caceres I, Cortes-Sempere M, Moratilla C, et al. IGFBP-3 hypermethylation-derived deficiency mediates cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 2010;29:1681–90.
26. Ceppi P, Mudduluru G, Kumarswamy R, et al. Loss of miR-200c expression induces an aggressive, invasive, and chemoresistant phenotype in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer Res*.8:1207–16.
27. Wang L, Xiang S, Williams KA, et al. Depletion of HDAC6 enhances cisplatin-induced DNA damage and apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *PLoS One*.7:e44265.
28. Gallardo E, Navarro A, Vinolas N, et al. miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis* 2009;30:1903–9.
29. Pronina IV, Loginov VI, Burdennyy AM, et al. DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer-associated micro-RNAs and breast cancer progression. *Gene*.604:1–8.
30. Schmidt M, Hellwig B, Hammad S, et al. A comprehensive analysis of human gene expression profiles identifies stromal immunoglobulin kappa C as a compatible prognostic marker in human solid tumors. *Clin Cancer Res*.18:2695–703.
31. Jusufovic E, Rijavec M, Keser D, et al. let-7b and miR-126 are down-regulated in tumor tissue and correlate with microvessel density and survival outcomes in non–small–cell lung cancer. *PLoS One*.7:e45577.
32. Ostrow KL, Michailidi C, Guerrero-Preston R, et al. Cigarette smoke induces methylation of the tumor suppressor gene NISCH. *Epigenetics*.8:383–8.
33. Guida F, Sandanger TM, Castagne R, et al. Dynamics of smoking-induced genome-wide methylation changes with time since smoking cessation. *Hum Mol Genet* 2015;24:2349–59.
34. Bao LJ, Jaramillo MC, Zhang ZB, et al. Nrf2 induces cisplatin resistance through activation of autophagy in ovarian carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*.7:1502–13.
35. Chen XL, Kunsch C. Induction of cytoprotective genes through Nrf2/antioxidant response element pathway: a new therapeutic approach for the treatment of inflammatory diseases. *Current Pharmaceutical Design* 2004;10:879–91.
36. Yao C, Qi Y, Zhao Y, Xiang Y, Chen Q, Fu W. Aptamer-based piezoelectric quartz crystal microbalance biosensor array for the quantification of IgE. *Biosensors and Bioelectronics* 2009;24:2499–503.
37. Mongelard F, Bouvet P. AS-1411, a guanosine-rich oligonucleotide aptamer targeting nucleolin for the potential treatment of cancer, including acute myeloid leukemia. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 2010;12:107–14.
38. Cui Y, She K, Tian D, Zhang P, Xin X. miR-146a inhibits proliferation and enhances chemosensitivity in epithelial ovarian cancer via reduction of SOD2. *Oncology Research* 2016;23:275–82.
39. Kim HR, Kim S, Kim EJ, et al. Suppression of Nrf2-driven heme oxygenase-1 enhances the chemosensitivity of lung cancer A549 cells toward cisplatin. *Lung Cancer* 2008;60:47–56.
40. Wu S, Zhang T, Du J. Ursolic acid sensitizes cisplatin-resistant HepG2/DDP cells to cisplatin via inhibiting Nrf2/ARE pathway. *Drug Design, Development and Therapy* 2016;10:3471–81.
41. Warnatz HJ, Schmidt D, Manke T, et al. The BTB and CNC homology 1 (BACH1) target genes are involved in the oxidative stress response and in control of the cell cycle. *J Biol Chem* 2011;286:23521–32.

“No hay barrera, cerradura ni cerrojo que puedan imponer a la libertad de mi mente”

Viirginia Woolf